



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

이학석사 학위논문

젓갈 미생물 *Bacillus idriensis*로부터 분리된
diketopiperazine 및 합성유도체의
생리활성 탐색

An exploratory study on the biological activity of
diketopiperazines from bacterium *Bacillus idriensis* and their
synthetic derivatives.



지도교수 서영완

2015년 2월

한 국 해 양 대 학 교 대 학 원

해양생명환경학과

곽 명 국

목 차

	Page
인준지	i
List of schemes -----	ii
List of tables -----	iii
List of figures -----	iv
List of abbreviations -----	vii
List of symbols -----	viii
Abstract -----	ix
 1. 서론 -----	 1
1.1 해양 생물 유래 천연물질의 탐색 -----	1
1.2 키틴 분해 미생물 -----	2
1.3 2,5-Diketopiperazine -----	2
 2. 재료 및 방법 -----	 4
2.1 시료 -----	4
2.2 시약 -----	5
2.3 기기 -----	5
2.4 균주의 선발 -----	6
2.4.1 계장으로부터 미생물 1차 선발 -----	6
2.4.2 2차 선발 -----	6

2.4.3 선정 균주의 특성	7
2.4.3.1 균의 동정 및 분류	7
2.4.3.2 균주 배양 조건 탐색	8
2.5 추출, 분획 및 분리	9
2.5.1 추출 및 분획	9
2.5.2 화합물의 분리	9
2.6 항산화 활성 실험	11
2.6.1 ESR을 이용한 radical 소거 활성 실험	11
2.6.1.1 DPPH radical 소거 활성 실험	11
2.6.1.2 Hydroxyl radical 소거 활성 실험	13
2.6.1.3 Superoxide radical 소거 활성 실험	15
2.6.2 Peroxynitrite 소거 활성 실험	17
2.7 세포 수준에서의 활성 실험	20
2.7.1 세포배양	20
2.7.2 Cell viability의 측정	21
2.7.3 ROS 소거활성 측정	23
2.7.4 NO 생성 억제 효과 측정	24
 3. 결과 및 고찰	 27
3.1 최종 선발 균주의 형태 및 생화학적 특성규명	27
3.1.1 형태 및 생화학적 특성규명	27
3.1.2 최적의 배양조건	30
3.2 분리한 이차 대사산물들의 구조결정과 활성검색	32

3.2.1 이차 대사산물들의 구조결정	32
3.2.2 항산화 활성 실험	48
3.2.2.1 ESR을 이용한 DPPH radical 소거 활성 실험	48
3.2.2.2 ESR을 이용한 hydroxyl radical 소거 활성 실험	49
3.2.2.3 ESR을 이용한 superoxide radical 소거 활성 실험	50
3.2.2.4 peroxynitrite 소거 활성 실험	51
3.2.2.5 SIN-1 으로부터 유도된 peroxynitrite 소거 활성	53
3.2.3 세포 수준에서의 활성 실험	55
3.2.3.1 ROS 측정	55
3.2.3.2 MTT assay	58
3.2.3.2.1 HT-29 세포에서의 MTT 실험	58
3.2.3.2.2 AGS 세포에서의 MTT 실험	58
3.2.3.2.3 MCF-7 세포에서의 MTT 실험	58
3.2.3.3 NO 생성 억제 효과	61
3.3 2,5-Diketopiperazine 유도체들의 합성과 활성검색	63
3.3.1 합성방법	63
3.3.1.1 Compounds 6, 7, 8 의 합성	63
3.3.1.2 Compounds 9, 10 의 합성	65
3.3.2 합성 유도체의 NMR spectrum	66
3.3.3 항산화 활성 실험	79
3.3.3.1 ESR을 이용한 DPPH radical 소거 활성 실험	79
3.3.3.2 ESR을 이용한 hydroxyl radical 소거 활성 실험	80
3.3.3.3 ESR을 이용한 superoxide radical 소거 활성 실험	81
3.3.3.4 peroxynitrite 소거 활성 실험	82

3.3.3.5 SIN-1 으로부터 유도된 peroxynitrite 소거 활성 -----	84
3.3.4 세포 수준에서의 활성 실험 -----	86
3.3.4.1 ROS 측정 -----	86
3.3.4.2 MTT assay -----	89
3.3.4.2.1 HT-29 세포에서의 MTT 실험 -----	89
3.3.4.2.2 AGS 세포에서의 MTT 실험 -----	89
3.3.4.2.3 MCF-7 세포에서의 MTT 실험 -----	89
3.3.4.3 NO 생 억제 효과 -----	92
4. 요약 및 결론 -----	94
5. 감사의 글 -----	96
6. 참고문헌 -----	97



본 논문을 광명국의 이학석사 학위논문으로 인준함.

위원장 임 선 영



위원 조 성 환



위원 서 영 완



2014년 12월 2일

한국해양대학교 대학원

List of schemes

	Page
Scheme 1. Isolation of compound. -----	10
Scheme 2. Measurement of DPPH radical scavenging activity. -----	12
Scheme 3. Measurement of hydroxyl radical scavenging activity. -----	14
Scheme 4. Measurement of superoxide radical scavenging activity. -----	16
Scheme 5. Measurement of the ONOO ⁻ scavenging activity. -----	19
Scheme 6. Synthesis of compounds 6-8 . -----	64
Scheme 7. Synthesis of compounds 9 and 10 . -----	65



List of tables

	Page
Table 1. Result of biochemical test for isolate strains. -----	29
Table 2. ^1H and ^{13}C NMR spectral data for cyclo (L-Pro-L-Tyr) (1). -----	35
Table 3. ^1H and ^{13}C NMR spectral data for cyclo (L-Pro-L-Phe) (2). -----	38
Table 4. ^1H and ^{13}C NMR spectral data for cyclo (L-Pro-L-Val) (3). -----	41
Table 5. ^1H and ^{13}C NMR spectral data for cyclo (L-Pro-L-Leu) (4). -----	44
Table 6. ^1H and ^{13}C NMR spectral data for cyclo (L-Pro-L-Ile) (5). -----	47
Table 7. ^1H and ^{13}C NMR spectral data for 3-benzylidene-2,5-piperazinedione (6). -----	68
Table 8. ^1H and ^{13}C NMR spectral data for 3,6-dibenzylidene-2,5-piperazinedione (7). -----	70
Table 9. ^1H and ^{13}C NMR spectral data for 3,6-(di-4-hydroxybenzylidene)-2,5-piperazinedione (8). -----	72
Table 10. ^1H and ^{13}C NMR spectral data for cyclo (L-Pro-Gly) (9). -----	75
Table 11. ^1H and ^{13}C NMR spectral data for cyclo (L-Pro-Ac-Gly) (10). -----	78

List of figures

	Page
Fig. 1. 2,5-diketopiperazine derivatives. -----	4
Fig. 2. Scavenging of the DPPH radical by phenol. -----	11
Fig. 3. Scavenging of the hydroxyl radical by DMPO. -----	13
Fig. 4. Scavenging of the superoxide radical by DMPO. -----	15
Fig. 5. Peroxynitrite (ONOO ⁻) mediated oxidation of DHR 123. -----	18
Fig. 6. Metabolization of MTT to a MTT formazan by viable cells. -----	22
Fig. 7. Degradation pathway of DCFH-DA in an oxidation- induced cellular system. -----	24
Fig. 8. Coloring reaction of NO ₂ ⁻ detection. -----	26
Fig. 9. 16S rRNA gene sequence of strain CGH-18. -----	28
Fig. 10. Neighbour-joining tree based on 16S rRNA gene sequence analysis indicates that strain CGH-18. -----	29
Fig. 11. Effect of time (hrs), pH, temperature on the cell growth of <i>B. idriensis</i> . -----	31
Fig. 12. ¹ H NMR spectrum of compound 1. -----	33
Fig. 13. ¹³ C NMR spectrum of compound 1. -----	33
Fig. 14. ¹ H COSY spectrum of compound 1. -----	34
Fig. 15. TOCSY spectrum of compound 1. -----	34
Fig. 16. ¹ H NMR spectrum of compound 2. -----	36
Fig. 17. ¹³ C NMR spectrum of compound 2. -----	36
Fig. 18. ¹ H COSY spectrum of compound 2. -----	37
Fig. 19. TOCSY spectrum of compound 2. -----	37
Fig. 20. ¹ H NMR spectrum of compound 3. -----	39
Fig. 21. ¹³ C NMR spectrum of compound 3. -----	39
Fig. 22. ¹ H COSY spectrum of compound 3. -----	40
Fig. 23. TOCSY spectrum of compound 3. -----	40

Fig. 24.	^1H NMR spectrum of compound 4.	-----	42
Fig. 25.	^{13}C NMR spectrum of compound 4.	-----	42
Fig. 26.	^1H COSY spectrum of compound 4.	-----	43
Fig. 27.	TOCSY spectrum of compound 4.	-----	43
Fig. 28.	^1H NMR spectrum of compound 5.	-----	45
Fig. 29.	^{13}C NMR spectrum of compound 5.	-----	45
Fig. 30.	^1H COSY spectrum of compound 5.	-----	46
Fig. 31.	TOCSY spectrum of compound 5.	-----	46
Fig. 32.	DPPH radical scavenging effect of Comounds 1-5 (% of control).	--	48
Fig. 33.	Hydroxyl radical scavenging effect of Comounds 1-5 (% of control).		49
Fig. 34.	Superoxide radical scavenging effect of Comounds 1-5 (% of control)		50
Fig. 35.	Scavenging activity of compounds 1-5 on authentic ONOO^- (% of control).	-----	52
Fig. 36.	Scavenging activity of compounds 1-5 on ONOO^- from SIN-1 (% of control).	-----	54
Fig. 37.	Inhibition effect of compounds 1-3 on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.	-----	56
Fig. 38.	Inhibition effect of compounds 4 and 5 on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.	-----	57
Fig. 39.	Effects of compounds 1-5 on HT-29 cell viability by MTT assay after 24 hrs.	-----	59
Fig. 40.	Effects of compounds 1-5 on AGS cell viability by MTT assay after 24 hrs.	-----	59
Fig. 41.	Effects of compounds 1-5 on MCF-7 cell viability by MTT assay after 24 hrs.	-----	60
Fig. 42.	Effects of compounds 1-5 on nitrite production in Raw 264.7 cells.		62
Fig. 43.	^1H NMR spectrum of compound 6.	-----	66
Fig. 44.	^{13}C NMR spectrum of compound 6.	-----	66
Fig. 45.	^1H COSY spectrum of compound 6.	-----	67
Fig. 46.	TOCSY spectrum of compound 6.	-----	67

Fig. 47.	^1H NMR spectrum of compound 7 .	69
Fig. 48.	^{13}C NMR spectrum of compound 7 .	69
Fig. 49.	^1H NMR spectrum of compound 8 .	71
Fig. 50.	^{13}C NMR spectrum of compound 8 .	71
Fig. 51.	^1H NMR spectrum of compound 9 .	73
Fig. 52.	^{13}C NMR spectrum of compound 9 .	73
Fig. 53.	^1H COSY spectrum of compound 9 .	74
Fig. 54.	TOCSY spectrum of compound 9 .	74
Fig. 55.	^1H NMR spectrum of compound 10 .	76
Fig. 56.	^{13}C NMR spectrum of compound 10 .	76
Fig. 57.	^1H COSY spectrum of compound 10 .	77
Fig. 58.	TOCSY spectrum of compound 10 .	77
Fig. 59.	DPPH radical scavenging effect of compounds 6-10 (% of control).	79
Fig. 60.	Hydroxyl radical scavenging effect of compounds 6-10 (% of control).	80
Fig. 61.	Superoxide radical scavenging effect of compounds 6-10 (% of control).	81
Fig. 62.	Scavenging activity of compounds 6-10 on authentic ONOO^- (% of control).	83
Fig. 63.	Scavenging activity of compounds 6-10 on ONOO^- from SIN-1 (% of control).	85
Fig. 64.	Inhibition effect of compounds 6-8 on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.	87
Fig. 65.	Inhibition effect of compounds 9 and 10 on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.	88
Fig. 66.	Effects of compounds 6-10 on HT-29 cell viability by MTT assay after 24 hrs.	90
Fig. 67.	Effects of compounds 6-10 on AGS cell viability by MTT assay after 24 hrs.	90
Fig. 68.	Effects of compounds 6-10 on MCF-7 cell viability by MTT assay after 24 hrs.	91
Fig. 69.	Effects of compounds 6-10 on nitrite production in Raw 264.7 cell.	93

List of abbreviations

c	: concentration
CD ₃ OD	: deuterium methanol
CH ₂ Cl ₂	: dichloromethane (methylene chloride)
¹³ C NMR	: carbon 13 nuclear magnetic resonance
¹ H COSY	: homonuclear correlation spectroscopy
DEPT	: distortionless enhancement by polarization transfer
DPPH	: 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
EtOAc	: ethyl acetate
ESR	: Fourier Transform Electron Spin Resonance Spectrometer
Fig.	: figure
H ₂ O	: water
¹ H NMR	: proton nuclear magnetic resonance
HMBC	: heteronuclear multiple-bond connectivity
HMQC	: heteronuclear multiple-quantum connectivity
HRFAB	: high resolution fast atom bombardment
Hz	: herz (sec ⁻¹)
IC ₅₀	: 50% inhibitory concentration
IR	: Infrared
LRFAB	: low resolution fast atom bombardment
MeOH	: methanol
MS	: mass spectroscopy
<i>n</i> -BuOH	: normal-butanol
NO·	: nitric oxide radical
NOESY	: nuclear overhauser enhancement spectroscopy
·O ₂ ⁻	: superoxide anion radical
·OH	: hydroxyl radical
ONOO ⁻	: peroxynitrite
RNS	: reactive nitrogen species
ROS	: reactive oxygen species
RP	: reverse phase
S	: substrate
SiO ₂	: silica gel
TLC	: thin layer chromatography
UV	: ultraviolet
<i>v</i> _{max}	: maximal velocity

List of symbols

J	Coupling constant (Hz)
M^+	Molecular ion
m/z	Mass to charge
R_f	Rate of flow
δ	Chemical shift



An exploratory study on the biological activity of diketopeperazines from bacterium *Bacillus idriensis* and their synthetic derivatives.

Kwak, Myoung Kuk

Division of Marine Environment and Bioscience, Korea Maritime
Ocean University.

Abstract

The human life span is getting longer and longer, partly due to newly-developed by drug and medical technology. Nevertheless, new diseases difficult to treat by current medical technology are increasing due to a variety of factors, some of which are environmental. Oxidative stress is also one of the important factors related to the increasing incidence of diseases; such stress may cause cell membrane damage, DNA oxidation, and protein denaturation.

As a part of our continuing search for antioxidants from natural resources, a bacterium CGH18 exhibiting antioxidizing and chitin-degrading activities in colloidal chitin culture medium was isolated from crab marinated in soy sauce and identified as *Bacillus idriensis* by a 16S rDNA sequence homology search.

The culture broth of the bacterium CGH-18 was extracted with EtOAc for 30 minutes using sonication. The extracted solution was evaporated under reduced pressure and then the residue was partitioned between water and *n*-butanol (*n*-BuOH). The organic layer was further partitioned between water

and methylene chloride (CH_2Cl_2). Antioxidant activities of the crude extract and its solvent fractions were evaluated using five different activity tests. Among them, the CH_2Cl_2 fraction showed the strongest antioxidant activities. Further purification of the CH_2Cl_2 fraction by silica preparative TLC followed by HPLC resulted in the isolation of five 2,5-diketopiperazines (compounds **1–5**). The chemical structure of isolated compounds was determined by ^1H , ^{13}C and extensive 2D NMR experiments such as ^1H COSY, TOCSY, gHMQC, and gHMBC, and by comparison with published spectral data.

Antioxidant activities of the isolated compounds (**1–5**) were measured on DPPH, hydroxyl, and superoxide radicals, and peroxynitrite. Compounds **1–3** significantly scavenged peroxynitrite induced from SIN-1 in ratios of 80.5, 62.2, and 59.5%, respectively, at the concentration of 50 μM . In addition, compound **1** showed the good scavenging effect on hydroxyl and superoxide radicals with ratios of 74.8% and 77.2% at 500 μM , respectively, while compound **2** showed a significant scavenging effect only for the hydroxyl radical (76.6% at 500 μM).

Antioxidant activities of the synthetic derivatives (**6–10**) were also evaluated in the same bioassay systems. Among them, compound **8** revealed the potent scavenging effect on DPPH and hydroxyl radicals, and authentic peroxide with scavenging ratios of 82.0% (500 μM), 79.8% (500 μM), and 75.6% (50 μM), respectively. Compounds **6** and **7** inhibited formation of hydroxyl radical in ratios of 81.2 and 80.8% at a concentration of 500 μM , respectively.

We investigated the antiproliferative effects of all compounds (**1–10**) against the growth of human cancer cells (AGS, HT-29, and MCF-7) as well as the inhibitory effects against nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated Raw 264.7 cells. None of the compounds (**1–10**) significantly inhibited the growth of human cancer cells. Compounds **1**, **3**, and **5** reduced the production of nitric oxide by more than 50%.

1. 서론

1.1 해양 생물 유래 천연물질의 탐색

현재 우리나라 평균 수명은 2002년 77.02 (세)에서 2012년에는 81.44 (세)로 10년 사이에 4.42세의 수명이 연장되었다. 이는 의학기술의 발달과도 상관이 있겠지만 생명연장에 대한 사람들의 관심과 노력 때문이라고도 할 수 있다. 사람들은 몸에 좋은 습관을 가지거나 몸에 좋은 음식을 섭취하는 등 다양한 방법으로 수명연장을 위한 노력을 하고 있다. 그렇지만 수명이 연장된 만큼 다양한 질병들이 발생하게 되었고 그 중에서도 DNA의 손상이나 단백질 변형 등에 의한 암의 발병은 산화 스트레스와 아주 밀접한 관계를 가진다. 산화 스트레스란 활성산소 생산계 및 소거계의 균형에 의해 거의 일정하게 유지되고 있던 생체 방어 수준이 약제, 방사선, 허혈등의 여러 가지 요인에 의해서 균형이 무너져 활성 산소가 신체를 공격하게 되어 생기는 스트레스이다. 이러한 이유에서 인체 내 활성 산소종의 생성을 억제하고 제거하기 위한 항산화 물질의 탐색이 오래전부터 행해져 왔으며, 합성항산화제인 butylated hydroxyanisole (BHA)과 butylated hydroxytoluene (BHT)이 개발되어 널리 사용되었다. 그러나 이들은 과량 섭취 시 심각한 질병을 유발하는 것으로 알려져 기존 합성 항산화제를 대체할 수 있는 안전한 천연 항산화제에 대한 연구가 많이 이루어졌다. 최근에 들어서는 육상생물뿐만 아니라 해양생물로부터 지금까지 발견된 항산화제들보다 훨씬 뛰어난 효과를 가진 항산화제들을 찾기 위해 노력이 경주 되고 있다. 해양에서 발견된 항산화제로는 해조류에서 분리된 phloroglucinol 유도체들이 있으며, 염생식물에서도 항산화 물질들이 분리되었다. 이 뿐만 아니라 해양동물과 해양미생물에서도 여러 종류의 항산화물질들이 분리되었다. 본 연구그룹에서는 천연으로부터 이러한 항산화제를 개발하기 위한 노력으로 우리 나라 고유의 해산식품인 젓갈에 서식하는 젓갈미생물의 이차 대사산물에 관심을 두게 되었다. 왜냐 하면 젓갈 해산물에 함유된 다중불포화지방산을 비롯한 산화에 민감한 여러 성분들이 젓갈 미생물에 의해서 생산되는 항산화제에 의해서 보호된다고 여겨지기 때문이다.

1.2 키틴 분해 미생물

현재 우리나라에서는 많은 양의 갑각류 껍질이 버려지고 있다. 국토해양부의 조사결과 2005년 당시 우리나라에서 연간 버려지는 갑각류 껍질의 양은 3,800MT, 전 세계적으로는 3,500,000MT 정도 된다고 한다. 갑각류의 껍질은 다량의 키틴으로 구성되어 있어서 키틴을 분해 할 수 있다면 많은 분야에 사용될 수 있을 것이다. 키틴을 분해하는 미생물에 대한 연구는 계속 되고 있으며 이러한 미생물들에 의해 생산된 키틴분해산물은 현재 친환경 비료로 이용되기도 한다. 본 연구그룹에서는 키틴껍질을 가진 갑각류의 젓갈에서 키틴을 분해하면서 동시에 항산화물질을 생성하는 미생물을 분리함으로써 버려지는 키틴을 이용하는 친환경적인 공정을 개발하는데 기여하고자 하였다.

1.3 2,5-Diketopiperazine

2,5-Diketopiperazine의 기본형태는 glycine anhydride이며 구조가 단단하고 다양한 결가지를 가질 수 있기 때문에 약을 디자인할 때 매력적인 뼈대가 된다. 그리고 천연에서 분리되었거나 합성된 2,5-diketopiperazine 유도체들은 암, 바이러스, 곰팡이, 박테리아를 억제하는 생리활성을 가진다.

*Bacillus idriensis*로부터 분리된 5가지 2,5-diketopiperazine들중 compound 1과 2가 비교적 좋은 활성을 나타냈기 때문에 이 화합물들의 화학구조에 존재하는 2,5-diketopiperazine 고리와 benzyl 치환기 사이에 이중결합을 도입하면 항산화제로 작용할 때 형성되는 중간체인 라디칼을 안정화시킬 수 있다고 가정하여 2,5-diketopiperazine 고리에 benzyldiene 작용기를 도입하는 합성을 시도하였다.

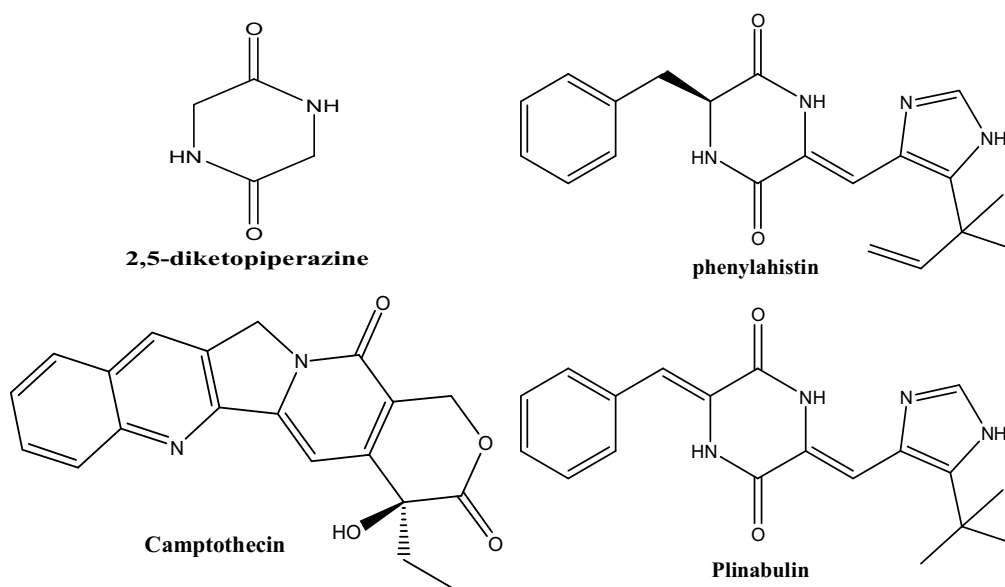


Fig. 1. 2,5-Diketopiperazine derivatives.



2. 재료 및 방법

2.1 시료

시료로 사용된 계장은 인천광역시 강화군에서 구입하여 사용하였으며, 선별 배지로 사용된 colloidal chitin은 2010년 동해안에서 나온 홍게 폐기물을 구입하여 만들어 사용하였다.

2.2 시약

Column packing materials은 RP 18(YMC-GEL ODS-AM, 12 nm, S-75 μm)을 사용하였으며 column chromatography에 사용한 모든 용매는 1급 시약을 구입하여 증류한 후 사용하였다. NMR 측정 시 사용한 용매는 CDCl_3 와 DMSO (Merck. deuterium degree 99.95%)를 사용하였다. Compound **1-5** 의 합성에 사용한 시약은 Sigma사 (St Louis, MO, USA)에서 구입하였고, compound **6-10** 의 합성에 사용한 시약은 TCI사에서 구입하였다.

항산화 실험에 사용된 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), 5,5-dimethyl-1-Pyrroline-N-Oxide (DMPO), riboflavin, 3-morpholinsydnonimine (SIN-1)과 dihydrorhodamine 123 (DHR 123)은 Sigma사 (St Louis, MO, USA)에서 구입하였고, Peroxynitrite (ONOO^-)는 Cayman (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양에 필요한 RPMI-1640과 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)은 Hyclone (Logan, Utah, USA)에서 구입하였다. FBS (Fetal Bovine Serum), Trypsin 그리고 100 units/mL Penicillin-Streptomycin은 GIBCO사 (USA)로부터 구입하여 사용하였다. MTT assay를 위한 kit (MTT cell proliferation Assay)는 R&D systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. ROS 측정에 사용된 DCFH-DA는 Molecular Probes inc. (Eugene, OR, USA)에서 구입하여 사용하였다. Lipopolysaccharide (LPS)와 Griess 시약인 sulfanilamide, N-(1-naphtyl)ethylene-diamine (NED) 는 Sigma 사에서 구입하였다.

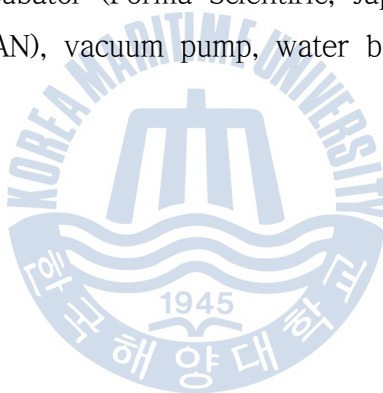
2.3 실험 기기

NMR 실험은 모두 Varian NMR 300 spectrometer를 사용하였다. Varian RI detector와 high performance liquid chromatography (HPLC, Dionex p580)를 사용하여 화합물을 정제 분리하였다.

항산화 활성 및 MTT 등의 측정에 UV-Vis spectrophotometer (Thermo Spectronic, England), Multi-detection microplate fluorescence spectrophotometer Synergy HT (Bio- TEK instruments, USA)를 사용하였다.

DPPH radical, Superoxide radical, Hydroxy radical 측정에는 Fourier Transform Electron Spin Resonance Spectrometer (JEOL(Japan), JES PX2300)를 사용하였다.

세포의 배양은 CO₂ incubator (Forma Scientific, Japan)를 사용하였고, rotary evaporator (EYELA, JAPAN), vacuum pump, water bath, pipet (JBM-pipet), 여과기 등을 사용하였다.



2.4 균주의 선발

2.4.1 계장으로부터 미생물 1차 선발

Marine agar 2216을 멸균 하여 petri dish에 12 mL씩 부어 고체배지를 만들고 계장을 갈아 10^{-2} ~ 10^{-5} 로 희석한 후 각각 0.1 mL 씩 배지에 도말하여 4-5일간 25℃에서 배양하였다. 미생물 집락이 형성된 접시에 멸균여과지를 colony 위에 올려서 대사산물 및 군체가 여과지에 옮겨지도록 하루를 더 배양한 다음 여과지를 분리하여 fume hood에 정치하고, DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 용액을 군체 및 대사산물이 묻은 여과지에 분무하여 보라색 반응이 일어나는 colony를 tooth pick로 새로운 배지에 옮겨 1차 선발하였다.

2.4.2 2차 선발

1차 선발에 의해 선정된 미생물을 petri dish 4 ~ 5개에 배양한 후 500 mL 삼각 플라스크에 멸균 처리한 액체배지 100 mL를 준비한다. 백금이를 이용하여 고체배지의 colony를 액체배지로 옮겨 25℃, 200 rpm, 2 ~ 3일간 진탕 배양하였다. 배양한 액체배지에 동량의 EtOAc를 사용하여 유기층을 확보하고 농축하여 활성 실험을 통해 2차 선발을 하였다.

2.4.3 선정 균주의 특성

2.4.3.1 균의 동정 및 분류

Marine agar를 이용하여 25℃에서 2일간 배양한 후 성장한 균주를 Total DNA extraction kit를 이용하여 DNA를 추출하였다. 16S rDNA는 16S rDNA primer, 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'; Escherichia coli nucleotide 8~27) 와 1518R (5'-AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA-3'; Escherichia coli nucleotide 1541~1522)와 PCR을 사용하여 genomic DNA로부터 증폭하였다. 16S rDNA는 전기영동 (0.8% agarose)을 통해 DNA가 증폭되었음을 확인하였으며 자동염기서열장치를 이용하여 염기서열을 결정하였다.

16S rDNA염기서열의 분석은 National Center Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)로부터 얻어진 분류군의 염기서열을 이용하여 서열화하였으며 Phylogenetic Interference Package (PHYLIP)로 서열 데이터를 분석하기 위해 사용되었다. Phylogenetic tree는 neighbour-joining방법을 이용하였으며, Evolutionary distances matrices는 Jukes & Cantor 모델에 따라 작성하고 neighbour-joining tree topology는 1000 resampling에 기초한 bootstrap analysis에 의해 평가되었다.

2.4.3.2 균주 배양 조건 탐색

선정 균주의 최적 배양 조건을 찾기 위해 pH, 배양시간, 온도가 균주의 성장에 미치는 영향에 대하여 실험하였다. 균주를 50 mL 액체배지에 접종한 다음 25℃, 200 rpm에서 진탕 배양하였으며, 배양된 균주를 새로운 액체배지에 4% (v/v)씩 첨가하여 진탕 배양하였다. 조건별로 얻어진 배양액은 15,000 rpm에서 1분 동안 원심분리 한 후, 상층액을 취하여 UV-Vis spectrophotometer로 660nm에서 optical density (O.D)를 측정하였다.



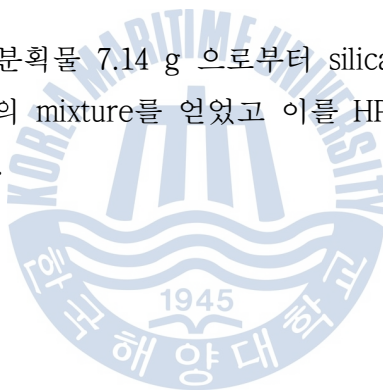
2.5 추출, 분획 및 분리

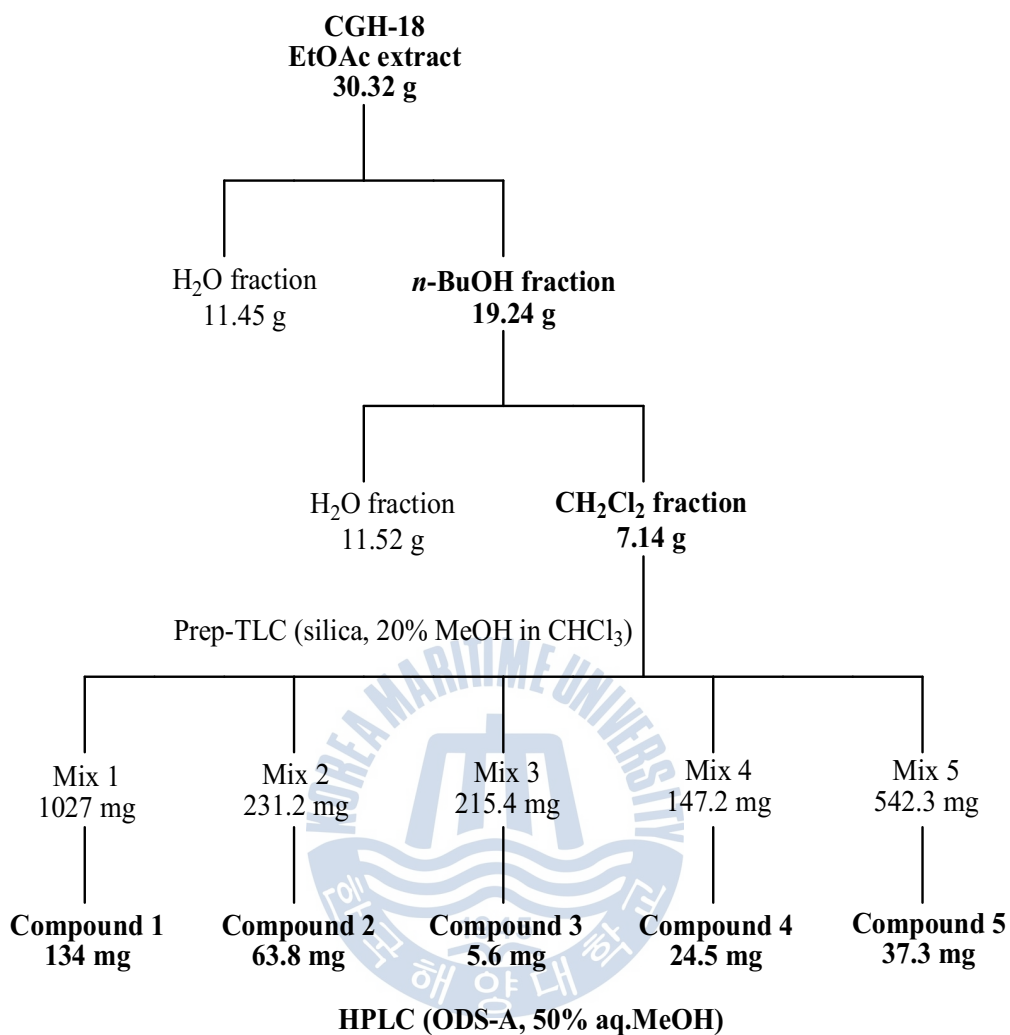
2.5.1 추출 및 분획

균체와 배양액의 혼합물 67 L에 동량의 EtOAc를 첨가하여 25℃, 200 rpm에서 30분 동안 진탕 배양하였다. 2차 대사산물의 효과적인 추출을 위해 1시간 동안 sonication 하였으며, 이 용액을 분별 깔대기를 이용하여 EtOAc 추출액을 얻었다. 이 과정을 3회 반복하여 얻어진 EtOAc층을 원심분리하고 상층액만을 40℃ 수욕 상에서 rotary vacuum evaporator (EYELA JAPAN, N-N series)로 농축하여 EtOAc 추출물 30.32 g을 얻었다. 조추출물을 H₂O와 *n*-BuOH로 분획한 뒤 *n*-BuOH은 농축하여 H₂O와 CH₂Cl₂로 재분획하여 각각의 분획물을 얻었다.

2.5.2 화합물의 분리

분획으로 얻은 CH₂Cl₂ 분획물 7.14 g 으로부터 silica prep TLC(20% MeOH in CHCl₃)를 이용하여 5가지의 mixture를 얻었고 이를 HPLC를 이용하여 compound 1-5 를 얻었다(Scheme 1).





Scheme 1. Isolation of compounds.

2.6 항산화 활성 실험

2.6.1 ESR을 이용한 radical 소거 활성 실험

2.6.1.1 DPPH radical 소거 활성 실험

1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)는 화학적으로 안정한 free radical을 가지는 수용성 물질로써 진한 보라색을 띠며 전자 공여체와 반응하여 안정한 분자인 diphenylpicrylhydrazine이 된다(Fig. 2). 이렇게 라디칼을 잃은 DPPH는 ESR을 이용하여 측정 시 에너지 흡수가 일어나지 않게 된다. 이렇게 산출된 값을 비교하여 활성 유무를 탐색한다. 실험방법은 아래와 같다.

먼저 각 농도별 시료 (2, 1, 0.5 mM)를 MeOH에 녹여 준비하고, DPPH 시약을 ethanol을 이용하여 $60\mu\text{M}$ 로 만든다. 만든 두 용액을 $60\mu\text{L}$ 씩 덜어서 섞고 2분 후 ESR 기기를 이용하여 측정하였다(Scheme 4).

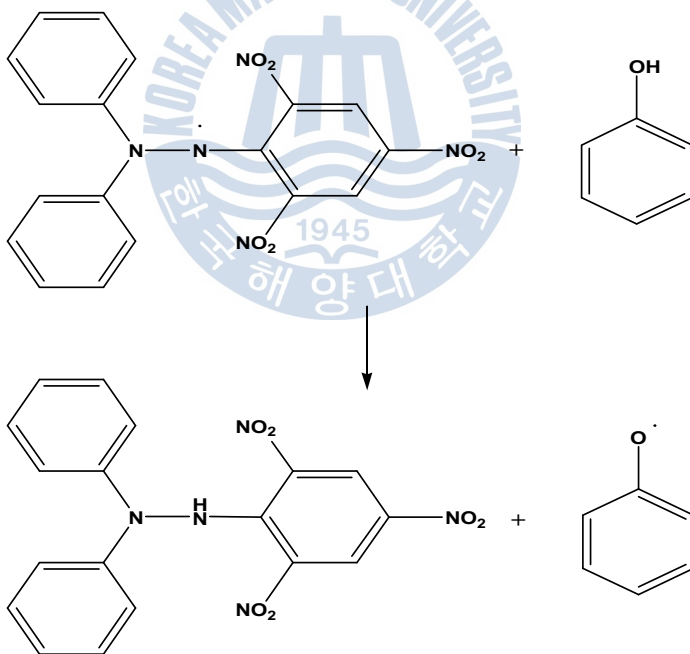
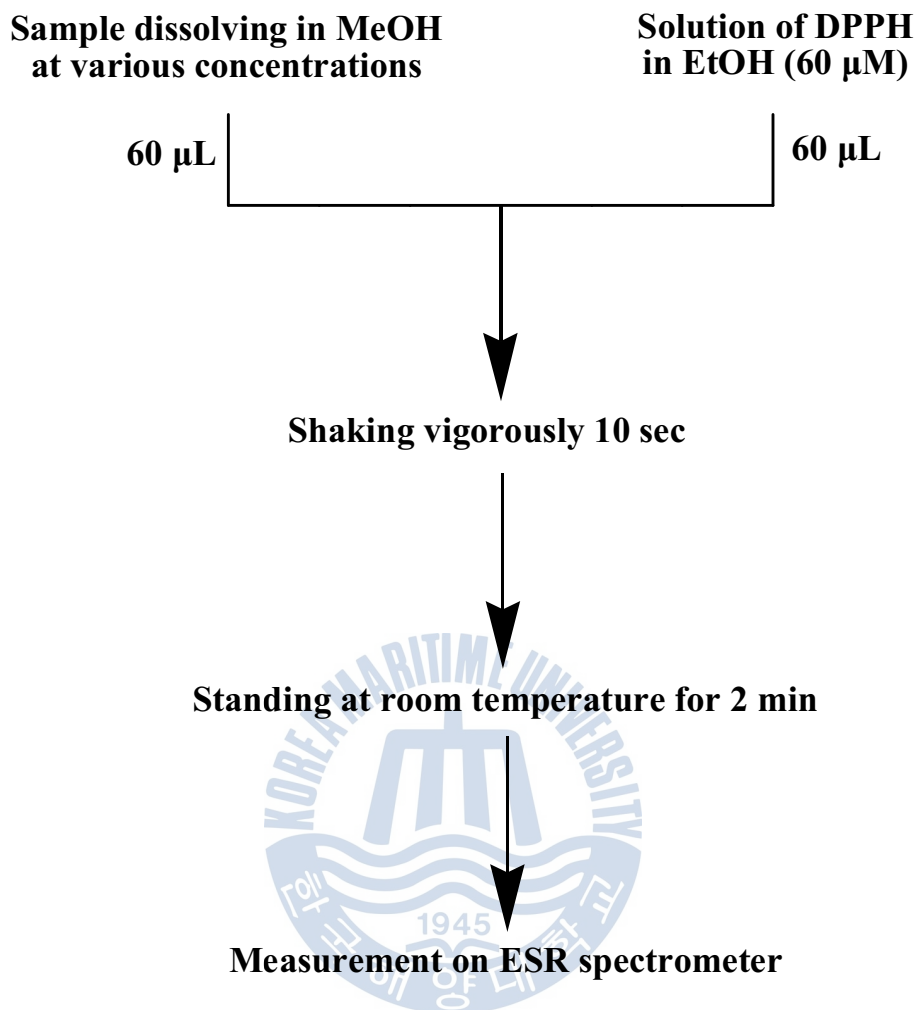


Fig. 2. Scavenging of the DPPH radical by phenol.



Scheme 2. Measurement of DPPH radical scavenging activity.

2.6.1.2 Hydroxyl radical 소거 활성 실험

Hydroxy radical 소거 측정 실험은 Fenton reaction을 이용한 실험으로 Fenton reaction으로 발생하는 hydroxyl radical이 DMPO와 반응하여 라디칼을 가진 DMPO-OH로 변하기 때문에 ESR을 이용하여 흡수되는 에너지를 측정 할 수 있게 된다(Fig. 3).

실험방법은 각 농도별 시료 20 μ L와 0.3M DMPO 20 μ L, 10 mM FeSO₄ 20 μ L 10 mM H₂O₂ 20 μ L를 넣고 2분 30초간 반응 시킨 후 ESR기기로 측정하였다(Scheme 3).

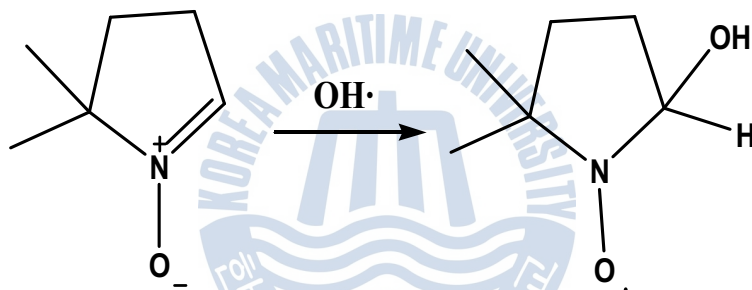
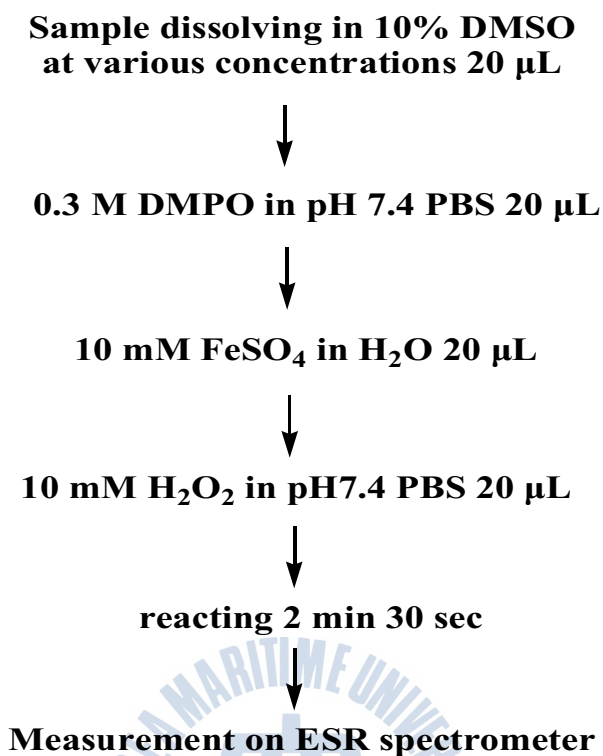


Fig. 3. Scavenging of the Hydroxyl radical by DMPO.



Scheme 3. Measurement of hydroxyl radical scavenging activity.

2.6.1.3 Superoxide radical 소거 활성 실험

Superoxide radical 소거 측정 실험은 Riboflavin에 UV를 조사하여 생긴 Superoxide radical이 DMPO와 반응하여 DMPO-O₂H로 변하여 ESR로 측정할 수 있게 된다(Fig. 4).

실험 방법은 각 농도별 시료 20 μ L와 0.8 mM riboflavin 20 μ L와 1.6 mM EDTA 20 μ L, 0.8 mM DMPO (20 μ L)를 넣고 365 nm 자외선을 1분간 조사한 후 ESR기기로 측정하였다(Scheme 4).

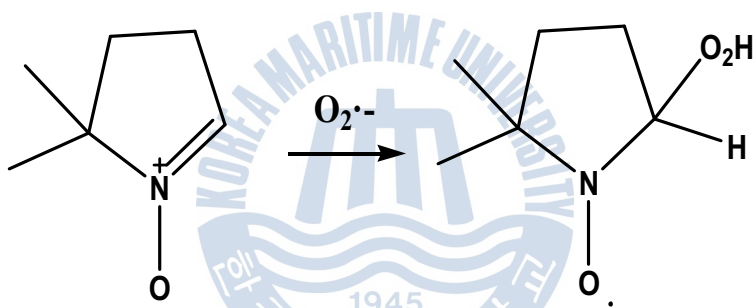


Fig. 4. Scavenging of the superoxide radical by DMPO.

**Sample dissolving in 10% DMSO
at various concentrations 20 μ L**



0.8 mM Riboflavin 20 μ L



1.6 mM EDTA 20 μ L



0.8 mM DMPO 20 μ L



Irradiation 365 nm UV for 1 min



Measurement on ESR spectrometer

Scheme 4. Measurement of superoxide radical scavenging activity.

2.6.2 Peroxynitrite 소거 활성 실험

ONOO⁻ 소거 활성은 dihydrorhodamine 123(DHR 123)의 산화되는 정도를 측정하였다(Fig. 5.). DHR 123 (5 mM)을 dimethylformamide로 녹여서 stock 용액은 질소로 purge하여 -80 °C에 보관하고, DHR 123 (f.c. 5 μM) 용액의 희석은 암실의 얼음 위에서, 사용하기 전에 조제하였다. Buffer는 90 mM sodium chloride, 50 mM sodium phosphate (pH 7.4)와 5 mM potassium chloride, DTPA (diethylenetriaminepenta acetic acid) 100 μM (f.c.)을 혼합하여 조제하며 사용하기 전에 냉장 보관하였다. 이 buffer 용액에 DHR 123 용액을 혼합한 뒤 시료와 peroxynitrite 를 첨가하고 5분간 실온에 둔 후 multi-detection microplate fluorescence spectrophotometer synergy HT로 측정하였다. Authentic peroxynitrite 대신에 SIN-1을 첨가하는 경우는 동일한 방법으로 실온에서 1시간 후에 측정하였다. SIN-1에 의한 DHR 123의 산화는 SIN-1이 ONOO⁻ 형태로 변하여 반응하기 때문에 authentic ONOO⁻ 보단 긴 시간이 필요하다. ONOO⁻ (f.c. 10 μM)의 바탕용액은 0.3N NaOH를 사용하였고, Excitation 파장은 485 nm, emission 파장은 530 nm로 하였으며 실온에서 측정하였다. 그리고 실험은 triplicate 로 행하였으며, 결과는 blank를 차감한 값을 평균하여 대조군에 대한 백분율로 계산하였다(Scheme 5) (Kooy et al., 1994).

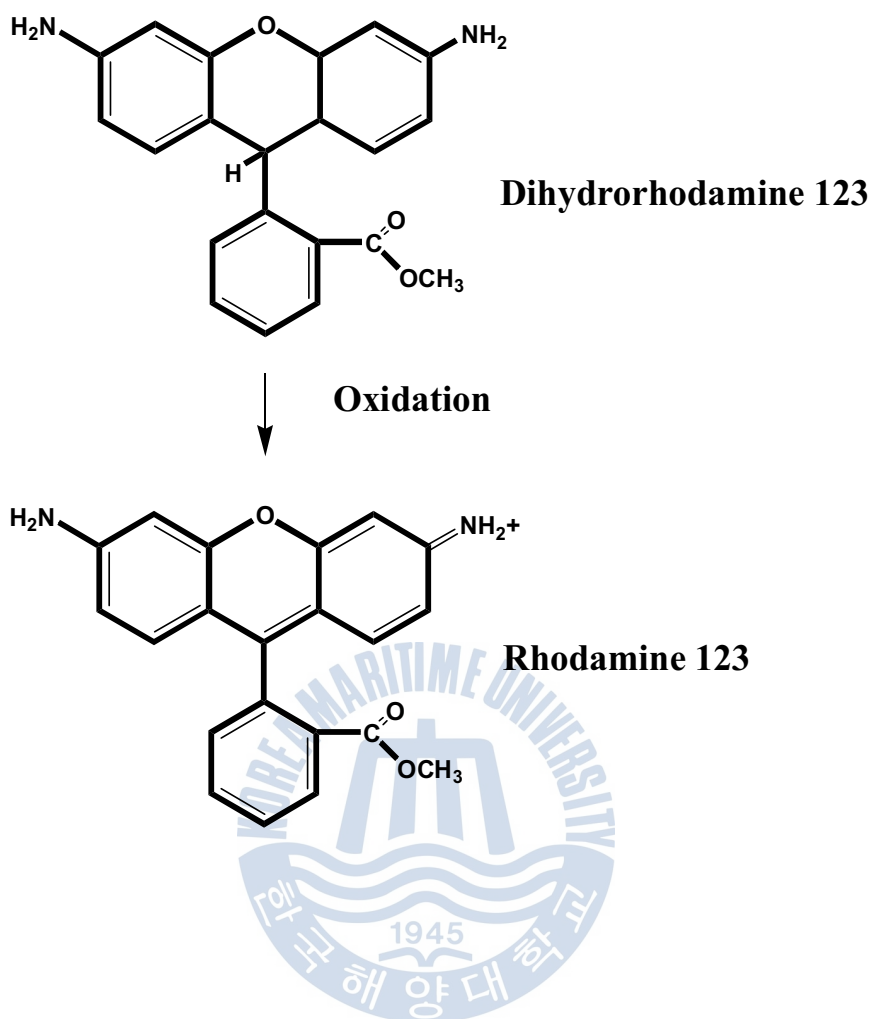


Fig. 5. Peroxynitrite (ONOO^-) mediated oolyxidation of DHR 123.

Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) 100 μ M



Dihydrorhodamine 123 5 μ M



Incubation at 37 $^{\circ}$ C for 1 min



Sample



SIN-1 200 μ M or peroxynitrite 5 μ M

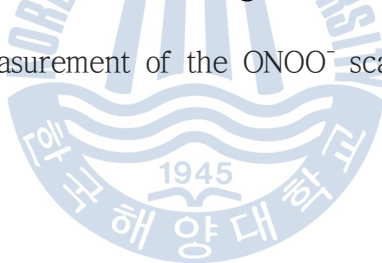


Measurement of fluorescence intensity

Excitation wavelength at 480 nm

Emission wavelength at 525 nm

Scheme 5. Measurement of the ONOO^- scavenging activity.



2.7 세포 수준에서의 활성 실험

2.7.1 세포배양

인간 섬유육종세포인 HT-1080 세포, 유방암 세포 MCF-7 그리고 인간 위암 세포 AGS와 대장암 세포 HT-29는 각각 한국 세포주 은행 (KCLB, Korean Cell Line Bank)에서 구입하였다. MCF-7은 100 unit/mL penicilin- streptomycin과 10% Fetal Bovine Serum (FBS)이 함유된 DMEM 배양액으로 배양하였고, HT-1080, HT-29, AGS는 100 unit/mL penicilin-streptomycin과 10% Fetal Bovine Serum (FBS)이 함유된 RPMI 배양액으로 배양하였다. 모든 세포를 cell culture dish에서 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 일주일에 5-6회 배지를 교환하고 5-6일 만에 PBS로 세척한 후 HT-1080, MCF-7, AGS, HT-29는 0.05% Trypsin-0.02 % EDTA로 부착된 세포를 분리하여 계대배양 하였다.



2.7.2 Cell viability의 측정

MTT assay를 이용하여 합성한 물질들의 cell viability에 미치는 영향을 확인할 수 있다. MTT assay는 세포의 증식과 살아있는 정도를 간접적으로 측정하는 것으로 항암제의 감수성에 대한 1차 선별검사의 목적으로 많이 사용된다. 대사과정이 온전한 암세포의 경우 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] crystal로 환원시킨다. 이는 살아있는 세포가 많을수록 MTT formazan을 많이 만들게 된다. 생성된 MTT formazan의 흡광도는 540 nm 의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아 있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다.

HT-29, AGS, MCF-7 세포 각각을 cell counting 하여 96 well micro-plate에 1×10^5 cells/mL 로 100 μ L 씩 분주하여 37°C, CO₂ incubator 에서 24시간 배양하였고, 배지 90 μ L와 준비한 농도별 compound를 각 well에 10 μ L 처리하고 24시간 37°C, CO₂ incubator에서 배양하였다. 배지를 제거하고 MTT 시약 5 mg을 1 mL PBS로 녹인 후, 10% FBS가 함유된 DMEM (AGS ; RPMI)배지 9 mL와 희석하여 각 well에 100 μ L 씩 처리하고 3~4시간 동안 incubation하여 formazan 형성을 관찰하였다. Formazan이 형성되면 MTT 시약처리 배지를 제거하고 DMSO 100 μ L를 넣어서 30분간 MTT formazan을 녹여내고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(Fig. 6.).

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

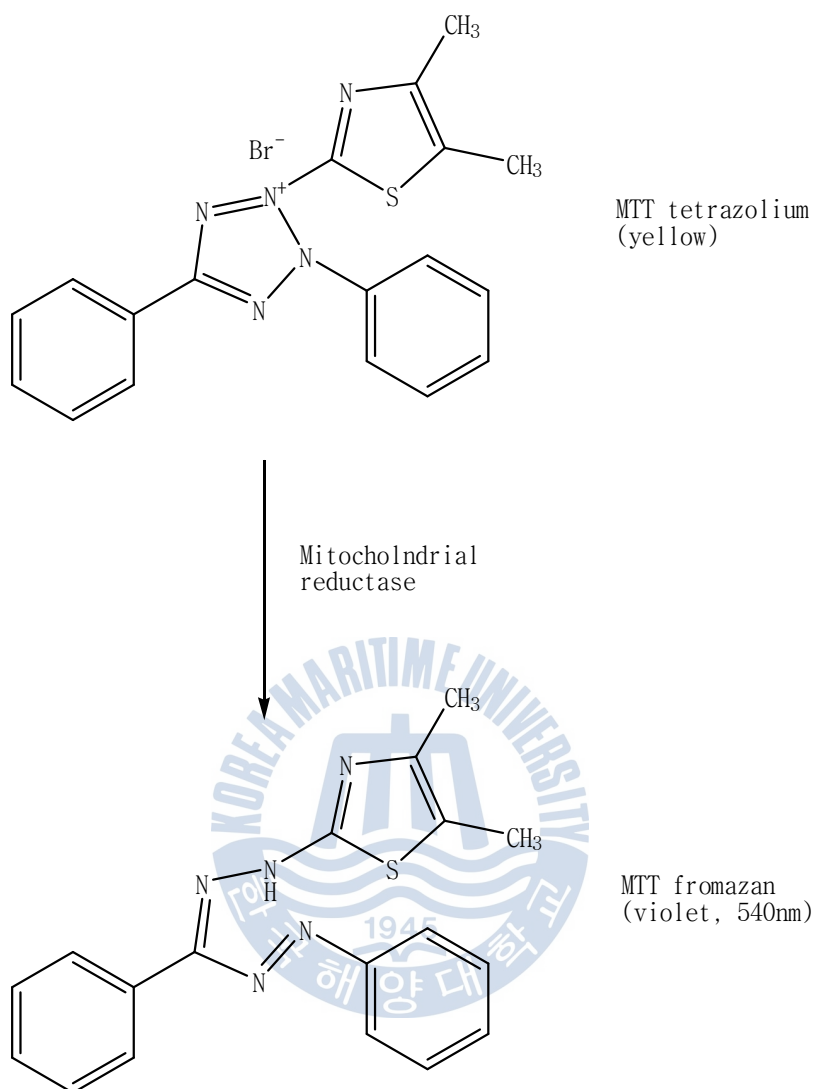


Fig. 6. Metabolization of MTT to a MTT formazan by viable cells.

2.7.3 ROS 소거활성 측정

세포의 free radical의 생성은 DCFH-DA assay로 측정하였다 (Okimotoa., 2000). DCFH-DA (fluorescence probe 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, Sigma)는 세포내 활성산소와 반응하여 형광물질을 만들어 내는 것으로 이 시약을 세포 속에 넣어 발생하는 형광을 측정함으로써 세포내의 활성 산소 농도를 측정할 수 있다. HT-1080 세포를 96 well에 분주한 후 24시간 배양하고, PBS 완충액으로 씻은 후 20 μ M DCFH-DA를 각 well에 주입하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 20분간 pre-incubation하였다. 각 well에 농도별로 시료를 처리하여 37°C 5% CO₂ incubator에서 1시간 incubation한 후, DCFH-DA를 없애고 cell은 다시 PBS 완충액으로 씻은 후 500 μ M H₂O₂ 처리하여 시간별로 DCF fluorescence를 ex. 485 nm, em. 530 nm에서 형광 분석기로 측정하였다(Fig. 7.).



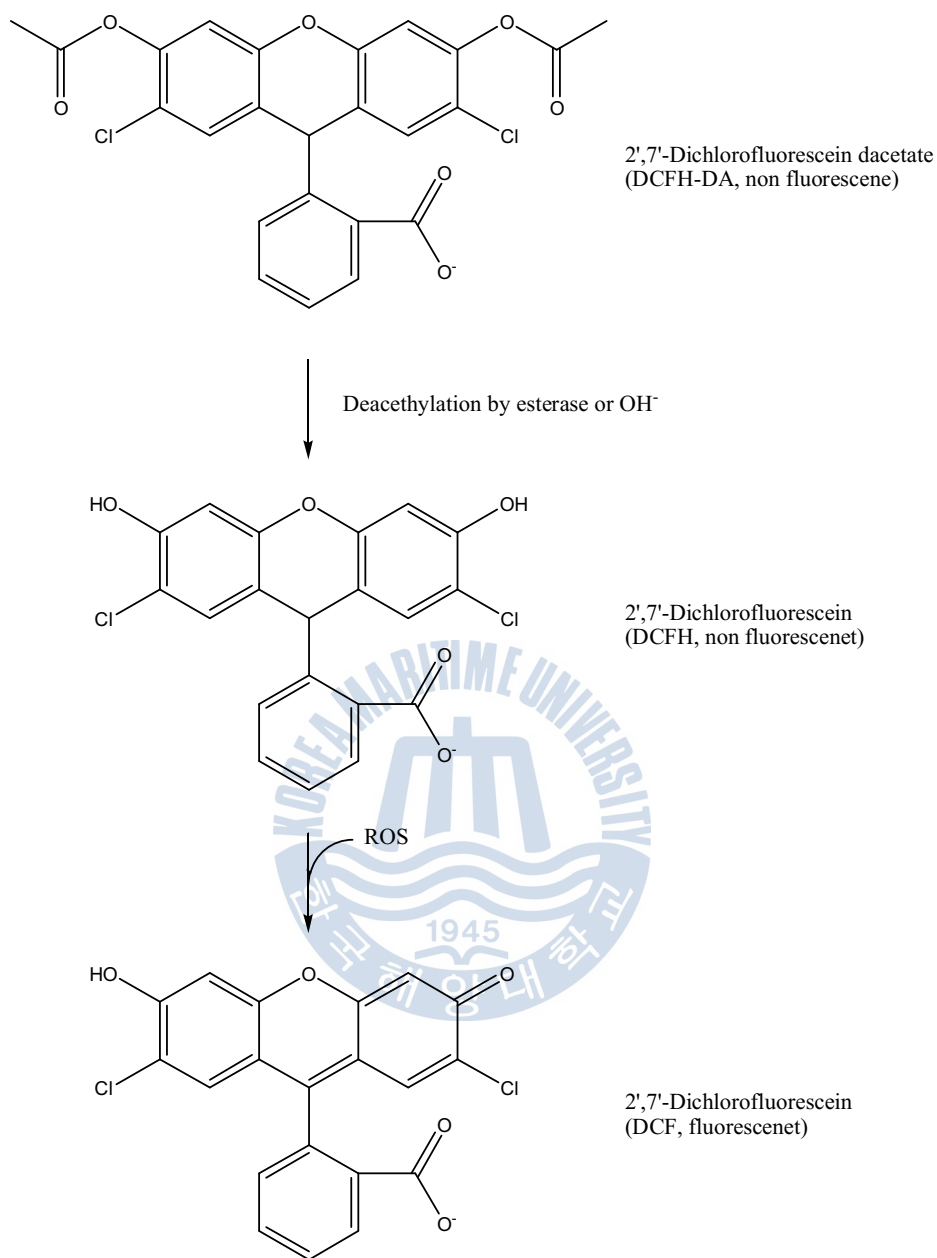


Fig. 7. Degradation pathway of DCFH-DA in an oxidation- induced cellular system.

2.7.4 NO 생성 억제 효과 측정

Nitric Oxide (NO) reduction assay는 macrophage의 주요 기능중 하나인 phagocytosis와 관련된 간접적인 활성측정의 한 방법으로 사용된다.

1-Naphtylenediamine, Sulfanilamide 그리고 NO_2^- 가 반응하여 Azocoupling을 이루는데 이 두 개의 고리 형태가 550 nm의 파장에서 최대의 흡광도 값을 나타내며 이를 측정하여 간접적으로 NO의 생성량을 정량할 수 있다 (Beda et al., 2005)(Fig. 8).

Raw 264.7 세포를 96 well micro-plate에 1×10^4 cells/mL 로 100 μL 씩 분주하여 37°C의 CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 10% FBS가 함유된 Modified Eagle Medion (MEM)으로 교체한 후 준비된 sample을 1시간 동안 전처리 하고, NO 생성을 유도하기 위해 1 $\mu\text{g/mL}$ (1 ppm)의 LPS를 처리한 후, 48시간 동안 37°C의 CO_2 incubator에서 배양하였다. LPS에 의해 자극된 Raw 264.7세포로부터 생성된 NO가 함유된 배지 50 μL 에 Griess시약 (0.1% N-1-naphtylethylenediamine : 1% sulfanilamide = 1 : 1) 50 μL 를 반응시켜 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sodium nitrate를 사용하여 측정된 흡광도로 표준곡선을 작성하여 NO의 농도별 흡광도를 얻었으며, 표준곡선을 실험 결과에 적용하여 생성된 NO의 함량을 정량하였다.

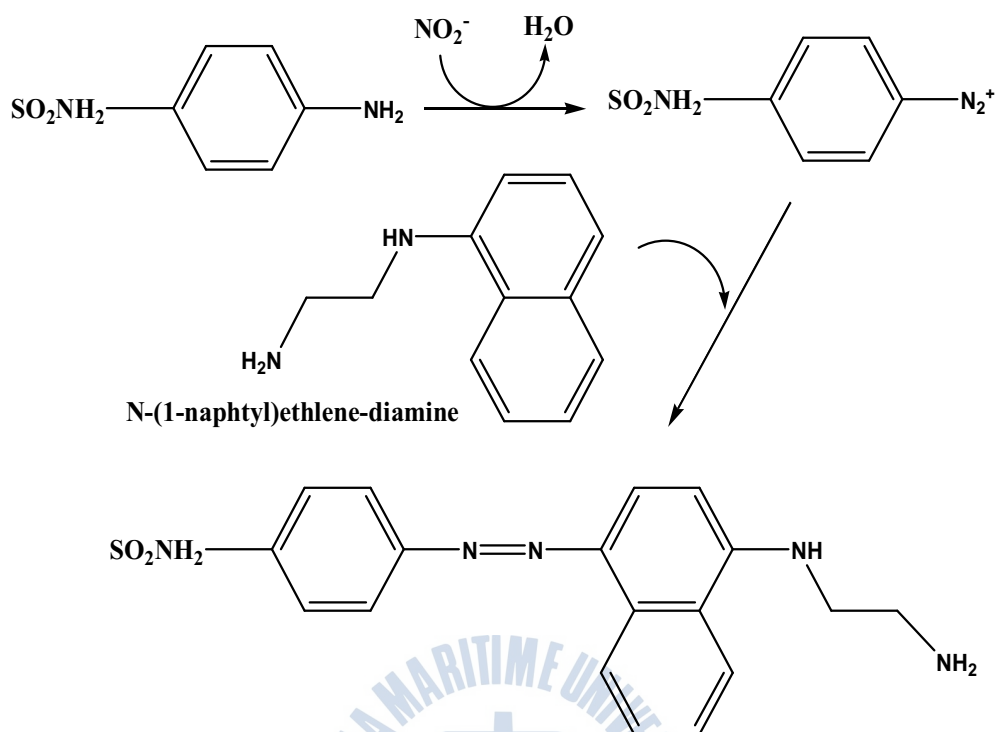


Fig. 8. Coloring reaction of NO_2^- detection.

3. 결과 및 고찰

3.1 최종 선발 균주의 형태 및 생화학적 특성규명

3.1.1 형태 및 생화학적 특성규명

최종적으로 항산화 능력이 좋고 chitin 분해 속도가 빠른 CGH 18을 선정하여 동정하였다. CGH 18의 염기서열은 Fig. 9.와 같이 결정되었으며 총 1,322염기를 대상으로 similarity 분석을 수행한 결과 *Bacillus idriensis* (AY904033)와 100%를 나타내었으며 계통도에서도 동일한 clade에 위치하였다(Fig. 10.). 따라서 CGH 18균주는 *Bacillus idriensis* 로 판정하였다.



1 CCAAGGCGGG CCAGCCTATA ATGCAGTCGA GCGGACTTGC TGGAGCTTGC TCCAGCAGGT
 61 TAGCGGCGGA CGGGTGAGTA ACACGTGGGC AACCTGCCTG TAAGACTGGG ATAACCTCGG
 121 GAAACCGGAG CTAATACCGG ATAGTATCTT GAACCGCATG GTTCAAGTTG GAAAGACGGT
 181 TTCGGCTGTC ACTTACAGAT GGGCCCGCGG CGCATTAGCT AGTTGGTGAG GTAATGGCTC
 241 ACCAAGGCAA CGATGCGTAG CCGACCTGAG AGGGTGATCG GCCACACTGG GACTGAGACA
 301 CGGCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTA GGAATCTTC CGCAATGGAC GAAAGTCTGA
 361 CGGAGCAACG CCGCGTGAGT GATGAAGGTT TTCGGATCGT AAAACTCTGT TGTTAGGGAA
 421 GAACAAGTGC GAGAGTAACT GCTCGCACCT TGACGGTACC TAACCAGAAA GCCACGGCTA
 481 ACTACGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGTA GGTGGCAAGC GTTGTCCGGA ATTATTGGGC
 541 GTAAAGCGCG CGCAGGCGGT TTCTTAAGTC TGATGTGAAA GCGCCCGGCT CAACCGGGGA
 601 GGGTCATTGG AAAGTGGGAA ACTTGAGTGC AGAAGAGGAG AGTGGAATTC CACGTGTAGC
 661 GGTGAAATGC GTAGAGATGT GGAGGAACAC CAGTGGCGAA GGCGACTCTC TGGTCTGTAA
 721 CTGACGCTGA GCGCGGAAAG CGTGGGGAGC GAACAGGATT AGATACCCTG GTAGTCCACG
 781 CCGTAAACGA TGAGTGCTAA GTGTTAGAGG GTTCCGCCC TTAGTGCTG CAGCTAACGC
 841 ATTAAGCACT CCGCTGGGG AGTACGGTCG CAAGACTGAA ACTCAAAGGA ATTGACGGGG
 900 GCGCGACAA GCGGTGGAGC ATGTGGTTTA ATTCGAAGCA ACGCAAGAA CCTTACCAGG
 961 TCTTGACATC CTTTGCCACT TCTAGAGATA GAAGGTTCCC CTTCGGGGGA CAAAGTGACA
 1021 GGTGGTGCAT GGTGTGCTC AGCTCGTGTG GTGAGATGTT GGGTTAAGTC CCGCAACGAG
 1081 CGCAACCCTT GATCTTAGTT GCCAGCATTG AGTTGGGCAC TCTAAGGTGA CTGCCGGTGA
 1141 CAAACCGGAG GAAGGTGGGG ATGACGTCAA ATCATCATGC CCCTTATGAC CTGGGCTACA
 1201 CACGTGCTAC AATGGATGGT ACAAAGGGCT GCGAGACCGC GAGGTTTAGC CAATCCCATA
 1261 AAACCATCT CAGTTCGGAT TGCAGGCTGC AACTCGCCTG CATGAAGCTG GAATCGTAGT
 1321 TAATCGCGGA TCAGCATGCC GCGGTGAATA CGTTCCCGGG CCTGTACAC ACCGCCCGTC
 1381 ACACCACGAG AGTTTGCAAC ACCCGAAGTC GGTGGGGTAA CCGCAAGGAG CCAGCCGCAT
 1441 ATAGGGGGTT CGGT

Fig. 9. 16S rRNA gene sequence of strain CGH-18.

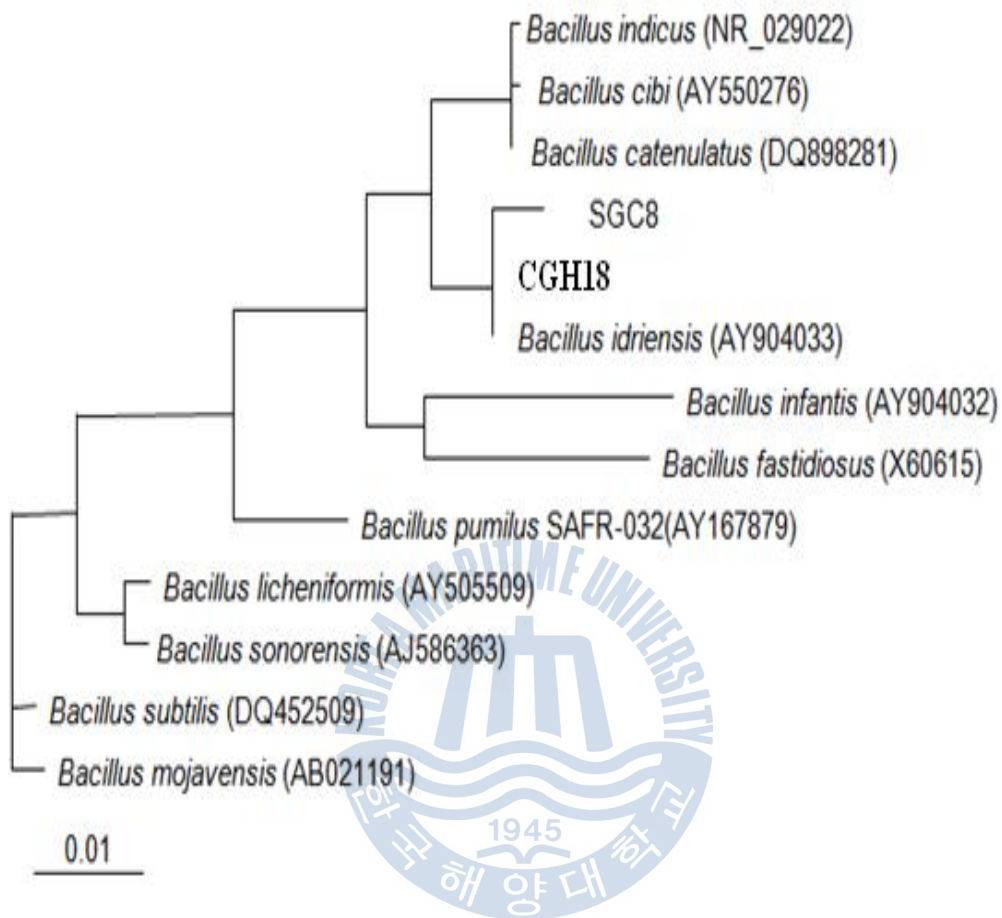


Fig. 10. Neighbour-joining tree based on 16S rRNA gene sequence analysis indicates that strain CGH-18.

<i>B. idriensis</i> (CGH-18)	
Gram's type	G+
Cell form	rod
Enzyme activity	
Reduction of nitrate to nitrite	-
Indol production	-
Fermentation (glucose)	-
Arginin dihydrolase	-
Urease	-
β -glucosidase(Esculin hydrolysis)	-
Protease(gelatin hydrolysis)	+
β -galactosidase	+
Assimilation of	
D-glucose	+
L-arabinose	-
D-mannose	-
D-mannitol	+
N-acetyl-glucosamine	+
D-maltose	+
Potassium gluconate	+
Capric acid	-
Adipic acid	-
Malate	+
Trisodium citrate	-
Phenylacetic acid	-

Table 1. Result of biochemical test for isolate strains.

3.1.2 최적의 배양조건

CGH 18의 최적 배양 조건을 선정하기 위하여 배양시간과 온도, pH 변화에 따른 균주의 생장을 측정하였다. 균주를 백금이로 50 mL 액체 배지에 접종한 다음 25°C, 200 rpm에서 진탕 배양하였으며, 배양된 균주를 새로운 액체 배지에 4% (v/v)씩 첨가하여 진탕 배양하였다. 조건별로 얻어진 배양액은 15,000 rpm에서 1분 동안 원심분리 한 후, 상층액을 덜어 탁도를 660 nm에서 측정하였다.

생장율은 접종 후 48시간 까지 증가하였고 48시간 이후에는 감소하였다. pH 변화에서는 pH 7에서 생장율이 좋았으며 온도 조건에서는 25°C에서 생장율이 가장 좋았다. 이러한 결과로 pH 7, 25°C에서 48시간 배양하여 이차대사산물을 추출하였다.

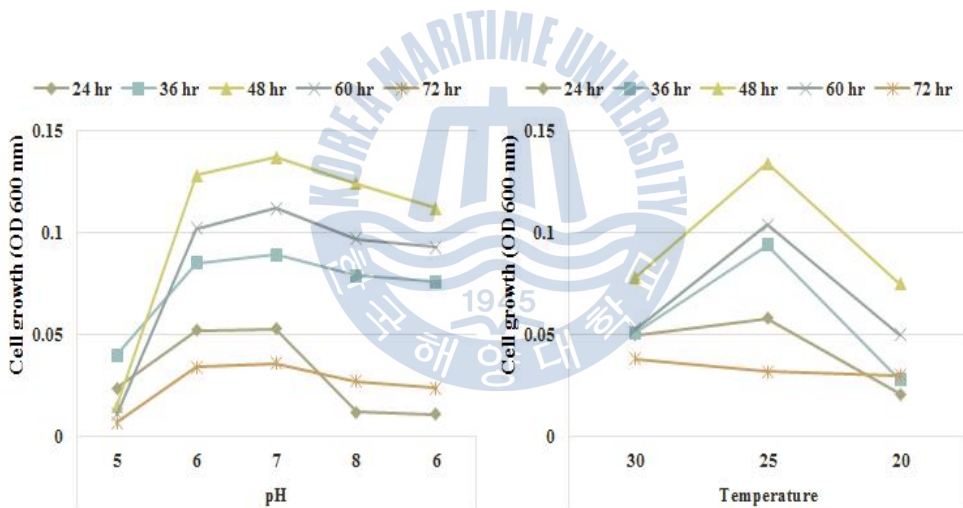


Fig. 11. Effect of time (hrs), pH, temperature on the cell growth of *B. idriensis*.

3.2 분리한 이차 대사산물들의 구조결정과 활성검색

3.2.1 이차 대사산물들의 구조결정

CH₂Cl₂층으로부터 분리된 5개 화합물들의 구조는 proton과 carbon NMR 분광 데이터와 ¹H COSY, TOCSY, gHMQC, gHMBC와 2D NMR 실험을 이용하여 구조를 결정하였고 문헌에 보고된 분광데이터를 비교하여 화합물의 구조를 확인하였다.

Compound **1** 은 무색의 비결정성 고체로 분리되었다. ¹H NMR spectrum에서 δ 7.04와 6.77에 두 개의 이중선(doublet)이 나타나 para 위치가 치환된 aromatic ring이 존재한다는 것을 보여 주었고 δ 4.08(1H, t, 7.6)와 4.20 (1H, dd, 10.3, 3.9)에 아미노산의 α -methine에 해당되는 신호가 나타났다. ¹³C NMR 스펙트럼에서도 aromatic region에서 관측된 4개의 신호(δ 155.3, 130.2, 127.1, 116.1)와 δ 59.2와 56.2에 나타난 2개의 신호가 이러한 사실을 지지하였다. 또한 δ 169.4와 165.0에 나타난 2개의 신호는 전형적인 amide 기(CONH)의 peak로 판단되었다. Compound 1의 전체적인 구조는 ¹H COSY, TOCSY, HMQC 및 HMBC와 같은 집중적인 2D NMR 실험을 통하여 2,5-diketopirazine ring을 가진 cyclo(L-Pro-L-Tyr)로 결정되었으며 문헌에 보고된 분광데이터와 비교하였을 때 측정된 값과 잘 일치하였다.

Compounds **2-5**의 경우에도 ¹H과 ¹³C NMR 스펙트럼이 compound **1** 과 유사한 패턴을 보여 비슷한 유도체들로 인식되었으며 2D NMR 실험과 문헌조사를 통하여 각각 **2** 는 cyclo(L-Pro-L-Phe), **3** 은 cyclo(L-Pro-L-Val), **4** 는 cyclo(L-Pro-L-Leu), **5** 는 cyclo(L-Pro-L-Ile)로 확인되었다.

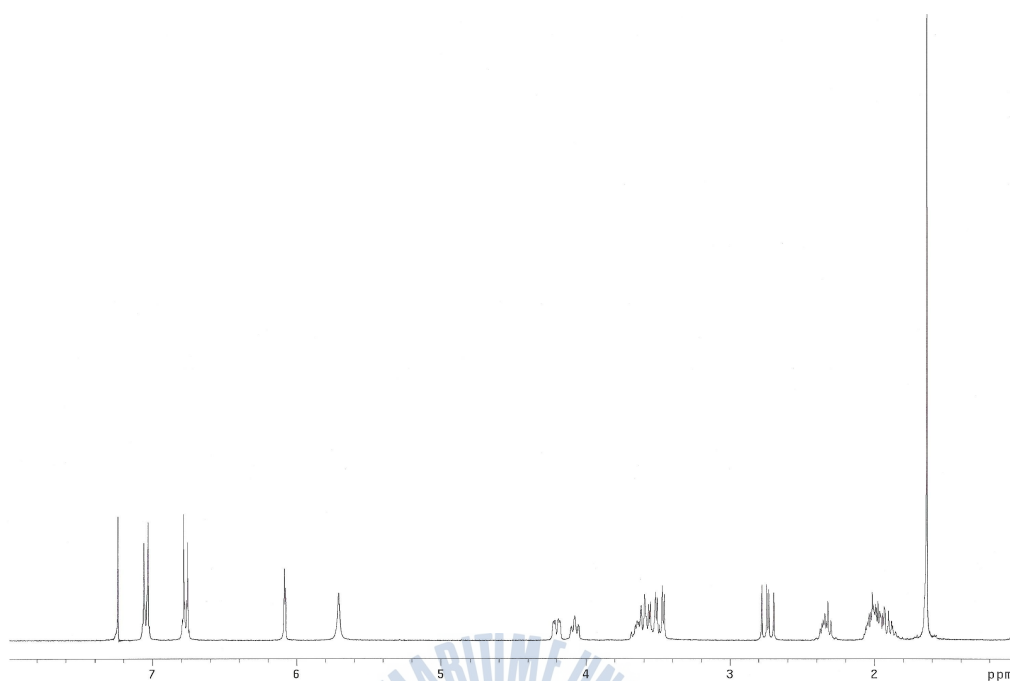


Fig. 12. ^1H NMR spectrum of compound **1** in CDCl_3 .

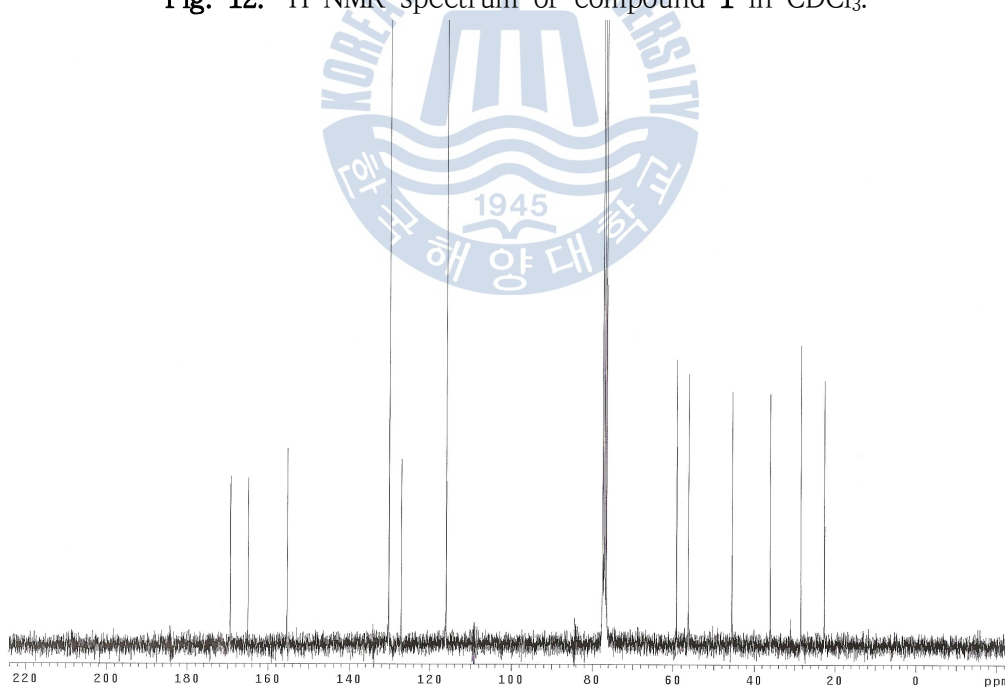


Fig. 13. ^{13}C NMR spectrum of compound **1** in CDCl_3 .

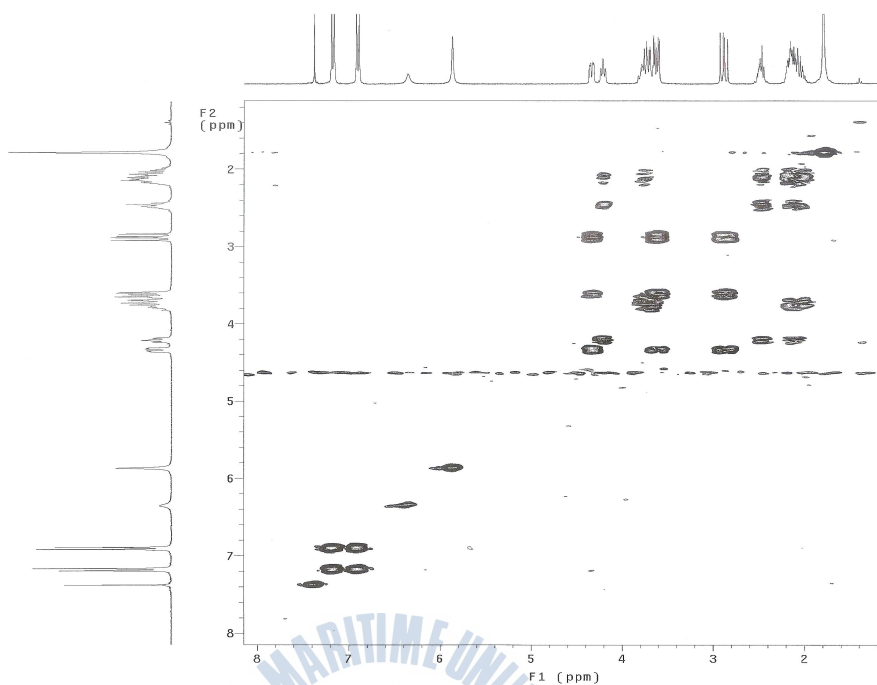


Fig. 14. ^1H COSY spectrum of compound **1** in CDCl_3 .

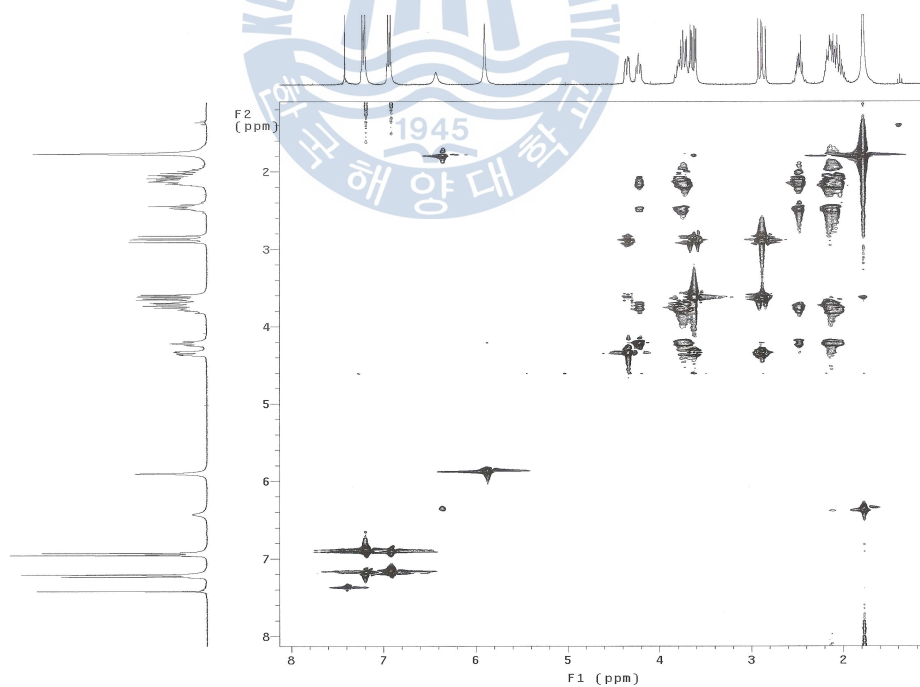


Fig. 15. TOCSY spectrum of compound **1** in CDCl_3 .

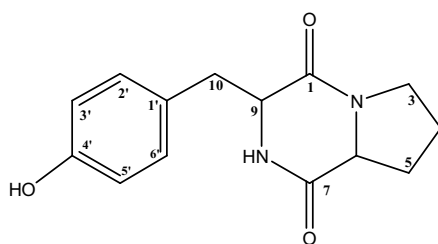


Table 2. ^1H and ^{13}C NMR spectral data for cyclo (L-Pro-L-Tyr) (**1**).

position	δ_{H} (H, m, Hz)	δ_{C}
1		165.0
2		
3	3.58 (2H, m)	45.5
4	1.97 (2H, m)	22.6
5	2.34 (1H, m), 1.97(1H, m)	28.4
6	4.08 (1H, t, 7.6)	59.2
7		169.4
8	5.77 (1H, NH)	
9	4.20 (1H, dd, 10.3, 3.9)	56.3
10	3.48 (1H, dd, 14.4, 11.0), 2.74 (1H, dd, 14.4, 10.3)	36.0
1'		127.1
2'	7.04 (1H, d, 8.5)	130.2
3'	6.77 (1H, d, 8.5)	116.1
4'		155.3
5'	6.77 (1H, d, 8.5)	116.1
6'	7.04 (1H, d, 8.5)	130.2

Measured in CDCl_3 at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ^1H COSY, TOCSY, gHMQC, and gHMBC experiments.

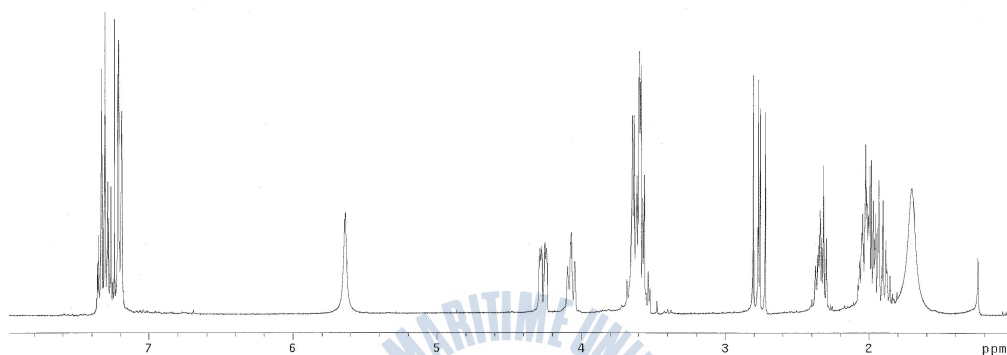


Fig. 16. ^1H NMR spectrum of compound **2** in CDCl_3 .

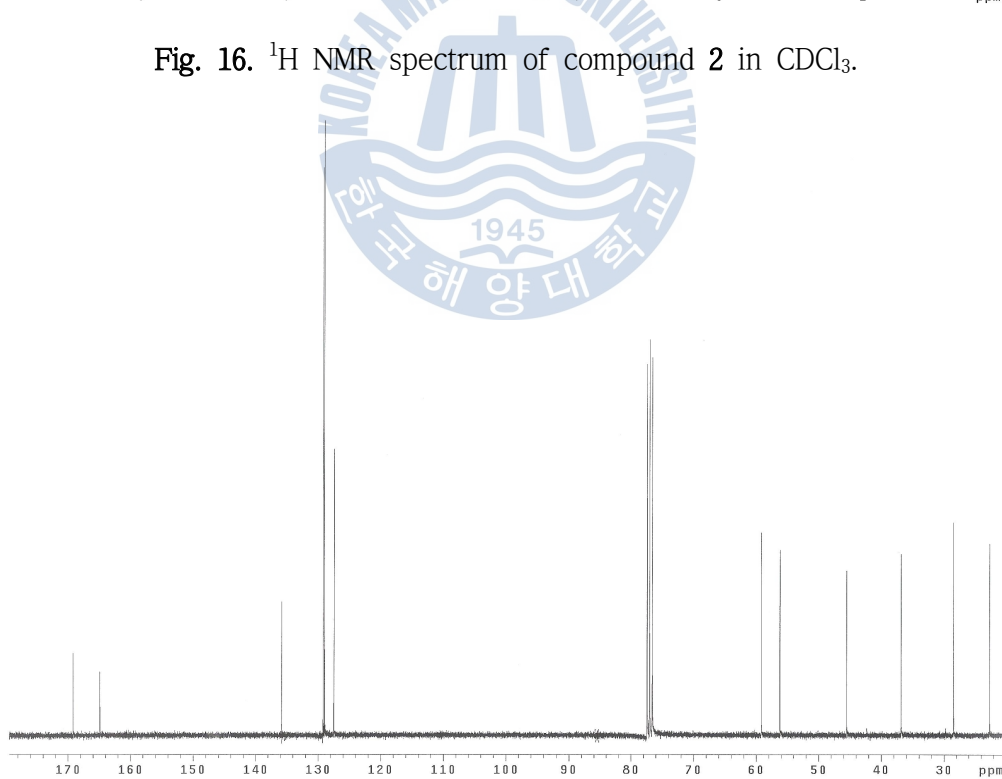


Fig. 17. ^{13}C NMR spectrum of compound **2** in CDCl_3 .

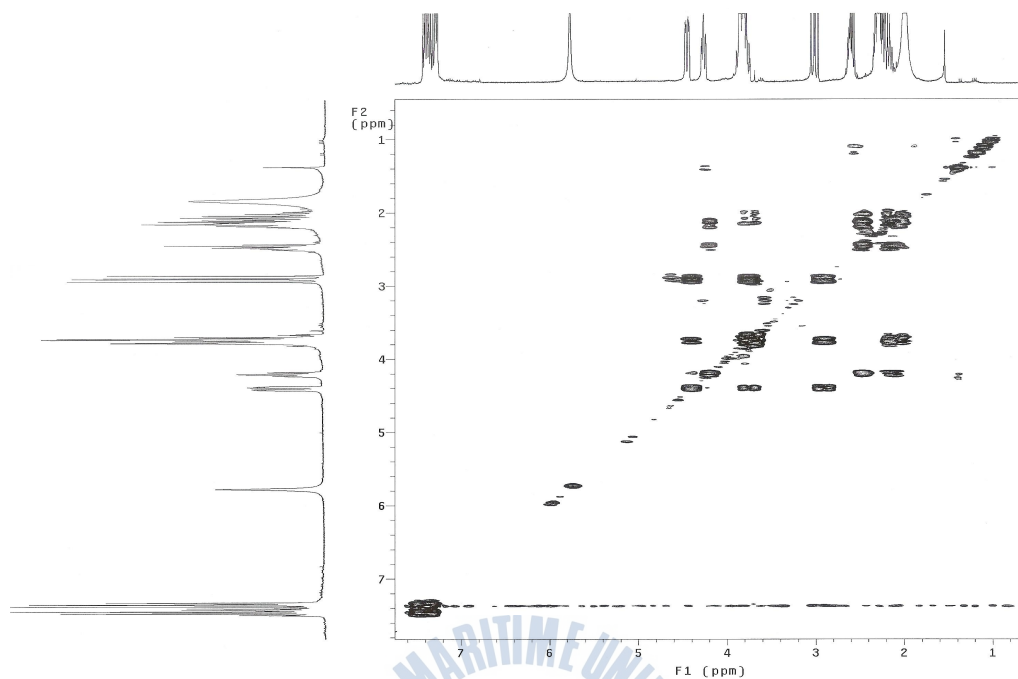


Fig. 18. ^1H COSY spectrum of compound **2** in CDCl_3 .

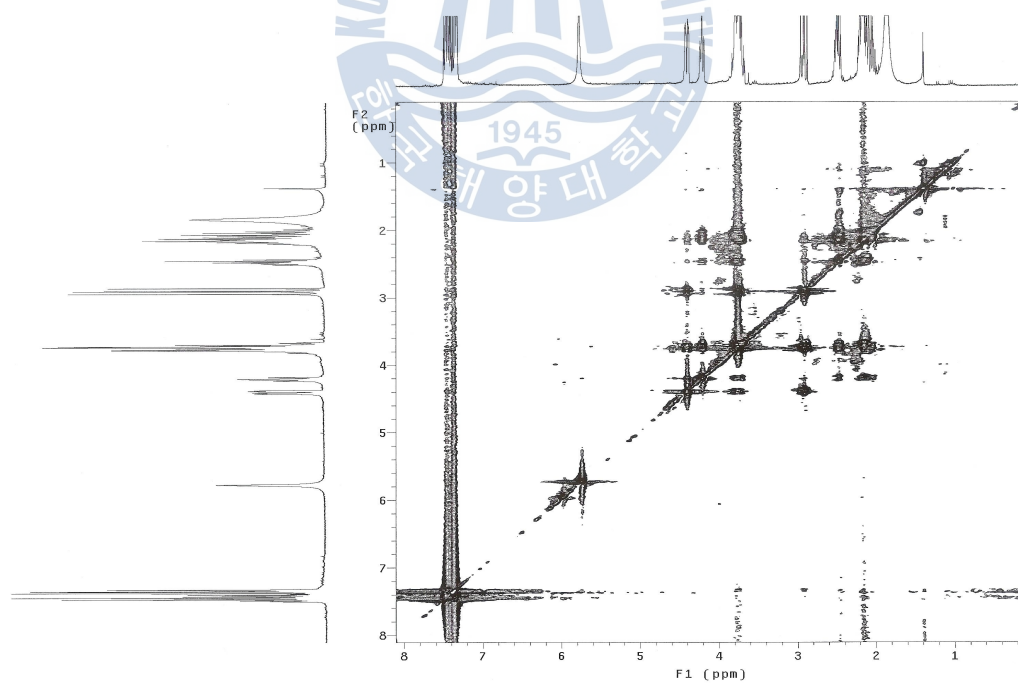


Fig. 19. TOCSY spectrum of compound **2** in CDCl_3 .

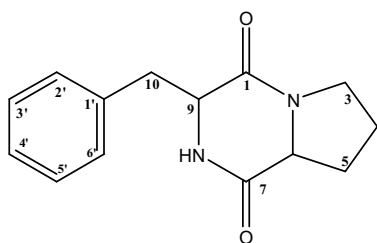


Table 3. ^1H and ^{13}C NMR spectral data for cyclo (L-Pro-L-Phe) (2).

position	δ_{H} (H, m, Hz)	δ_{C}
1		164.9
2		
3	3.60 (2H, m)	45.5
4	1.91 (2H, m)	22.6
5	2.33 (1H, m), 2.05(1H, m)	28.4
6	4.07 (1H, dd, 8.4, 6.5)	59.2
7		169.2
8	5.64 (1H, NH)	
9	4.26 (1H, ddd, 10.7, 3.6, 0.8)	56.2
10	3.60 (1H, m), 2.76 (1H, dd, 14.3, 10.7)	36.8
1'		135.8
2'	7.36–7.18(5H, m)	129.0
3'	7.36–7.18(5H, m)	129.2
4'	7.36–7.18(5H, m)	127.5
5'	7.36–7.18(5H, m)	129.2
6'	7.36–7.18(5H, m)	129.0

Measured in CDCl_3 at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ^1H COSY, TOCSY, gHMQC, and gHMBC experiments.

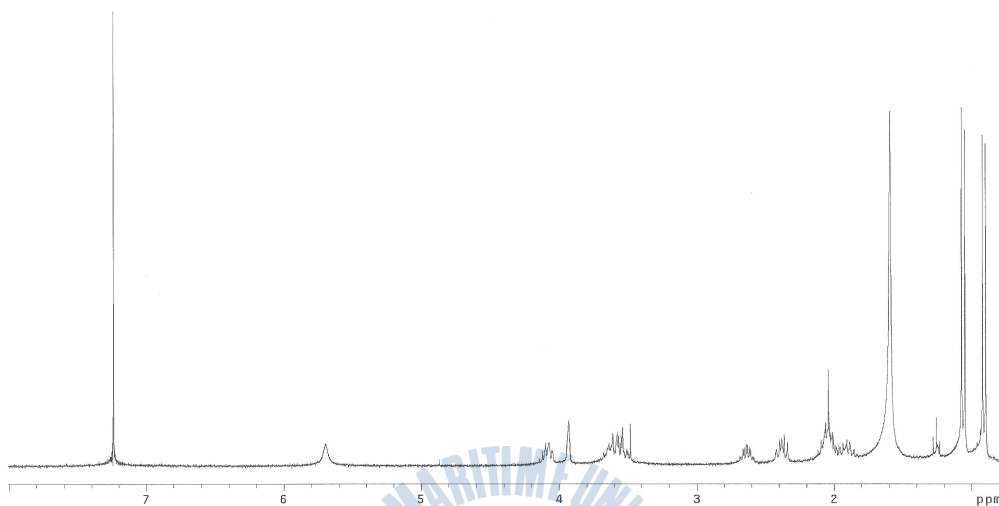


Fig. 20. ^1H NMR spectrum of compound **3** in CDCl_3 .

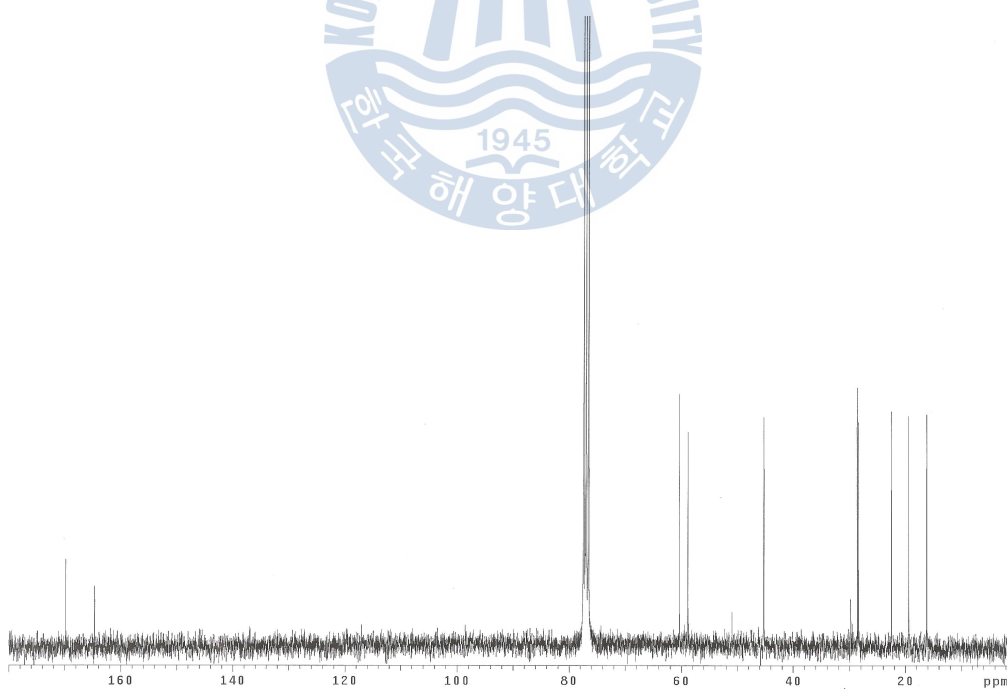


Fig. 21. ^{13}C NMR spectrum of compound **3** in CDCl_3 .

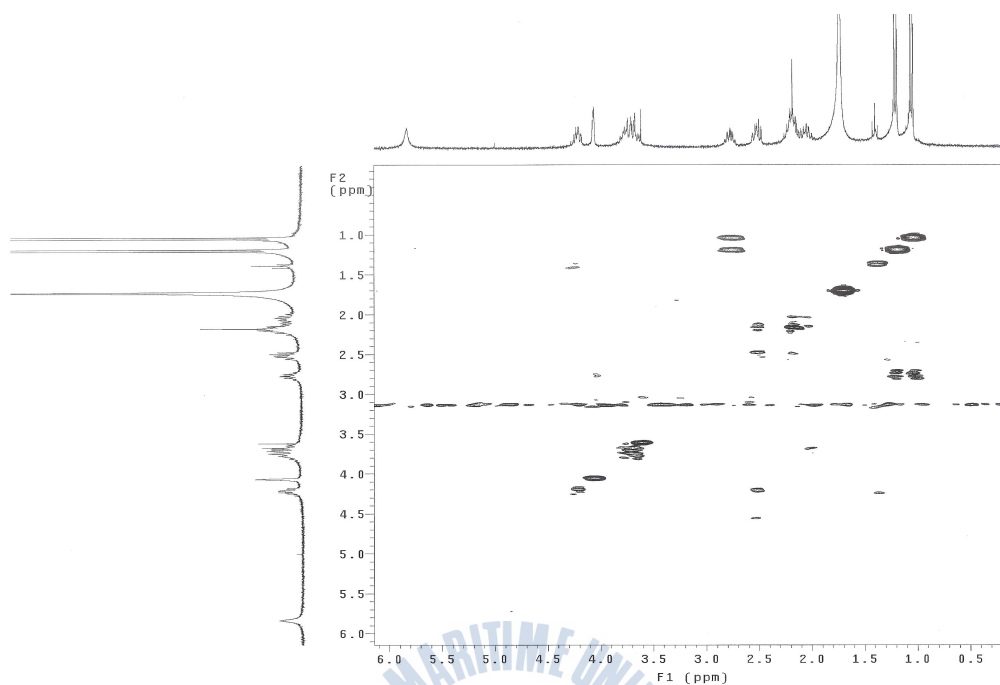


Fig. 22. ^1H COSY spectrum of compound **3** in CDCl_3 .

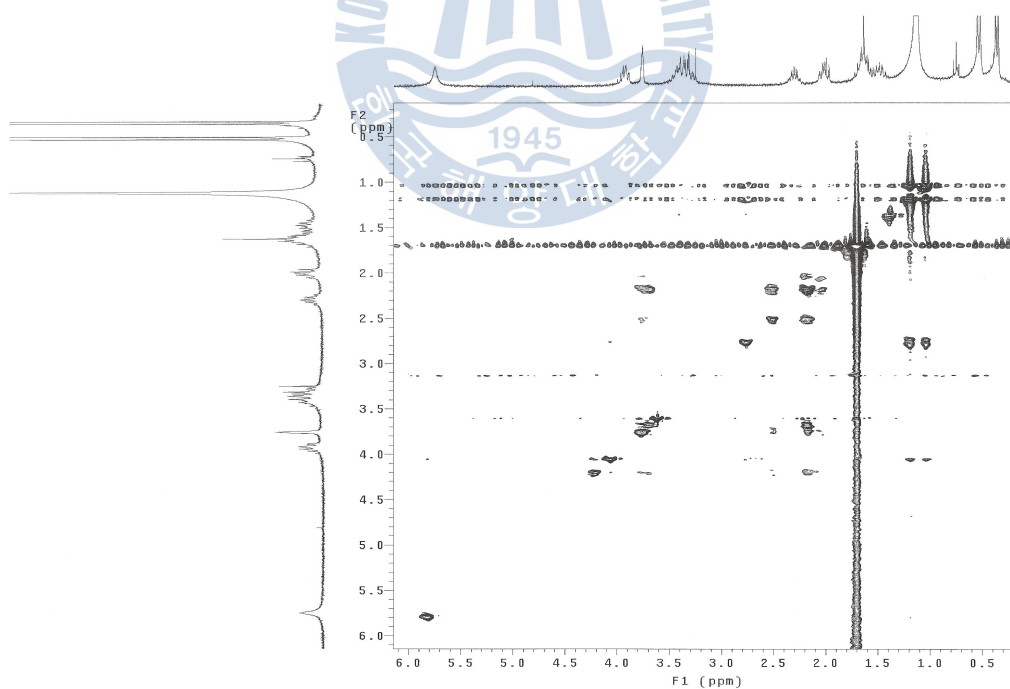


Fig. 23. TOCSY spectrum of compound **3** in CDCl_3 .

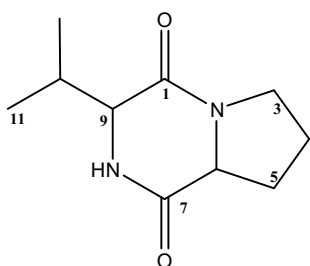


Table 4. ^1H and ^{13}C NMR spectral data for cyclo (L-Pro-L-Val) (**3**).

position	δ_{H} (H, m, Hz)	δ_{C}
1		169.8
2		
3	3.58 (2H, m)	45.1
4	2.01 (1H, m), 1.91 (1H, m)	22.3
5	2.38 (1H, m), 2.05 (1H, m)	28.5
6	4.08 (1H, dd, 14.4, 7.2)	58.8
7		164.8
8	5.70 (1H, NH)	
9	3.93 (1H, br s)	60.3
10	2.63 (1H, m)	28.3
11	0.91 (3H, d, 7.2)	19.3
10-Me	1.06 (3H, d, 7.2)	16.0

Measured in CDCl_3 at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ^1H COSY, TOCSY, gHMBC, and gHMBC experiments.

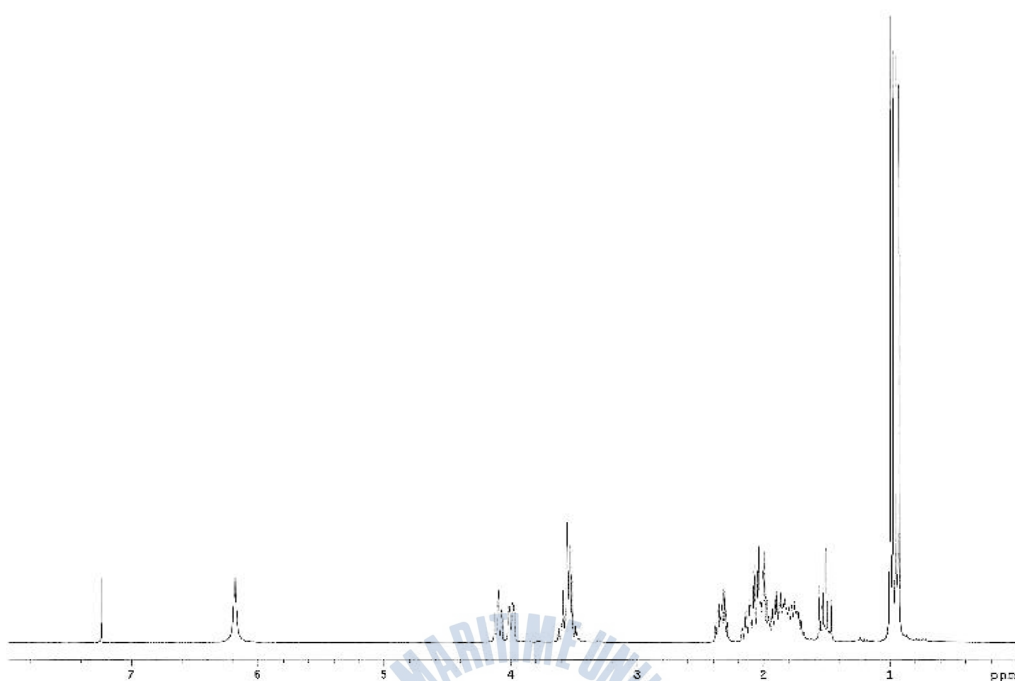


Fig. 24. ^1H NMR spectrum of compound **4** in CDCl_3 .

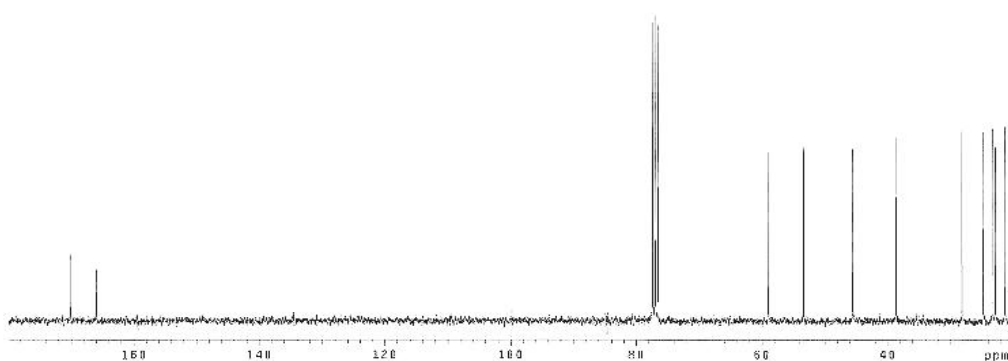


Fig. 25. ^{13}C NMR spectrum of compound **4** in CDCl_3 .

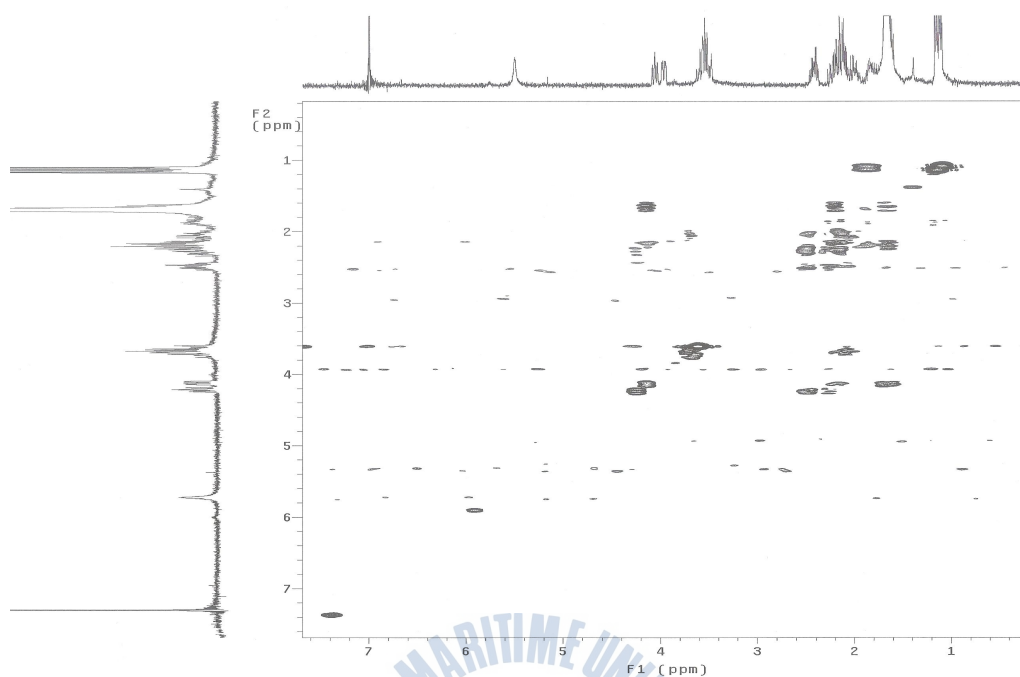


Fig. 26. ^1H COSY spectrum of compound **4** in CDCl_3 .

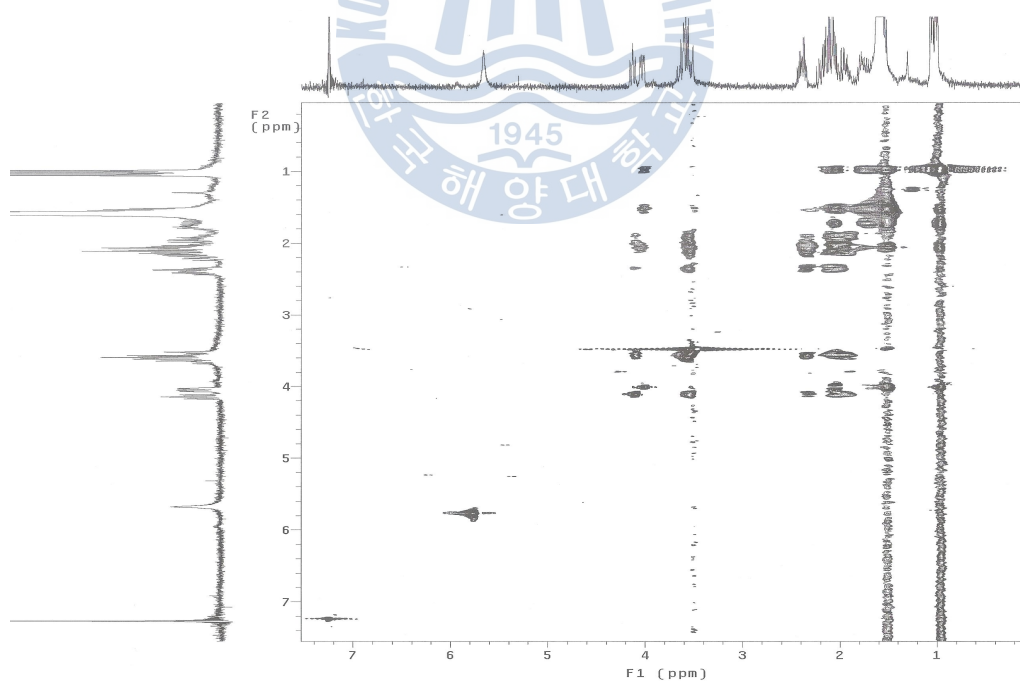


Fig. 27. TOCSY spectrum of compound **4** in CDCl_3 .

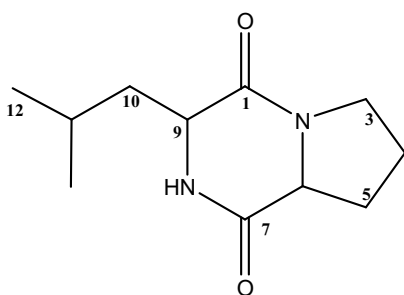


Table 5. ^1H and ^{13}C NMR spectral data for cyclo (L-Pro-L-Leu) (**4**).

position	δ_{H} (H, m, Hz)	δ_{C}
1		170.1
2		
3	3.55 (2H, m)	45.5
4	2.01 (1H, m), 1.90 (1H, m)	23.3
5	2.34 (1H, m), 2.13 (1H, m)	28.2
6	4.10 (1H, t, 8.1)	59.0
7		166.0
8	6.18 (1H, NH)	
9	4.00 (1H, dd, 9.6, 3.6)	53.4
10	2.01 (1H, m), 1.51 (1H, ddd, 14.3, 9.6, 5.0)	38.6
11	1.75 (1H, m)	24.7
12	0.94 (1H, d, 6.5)	22.8
11-Me	0.99 (1H, d, 6.5)	21.3

Measured in CDCl_3 at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ^1H COSY, TOCSY, gHMBC, and gHMBC experiments.

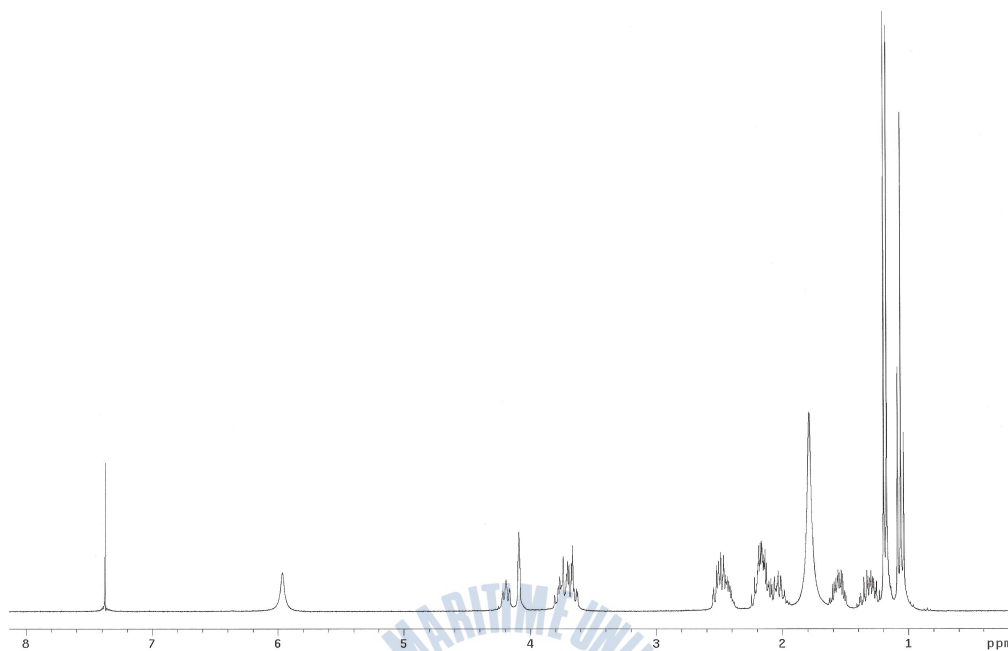


Fig. 28. ^1H NMR spectrum of compound **5** in CDCl_3 .

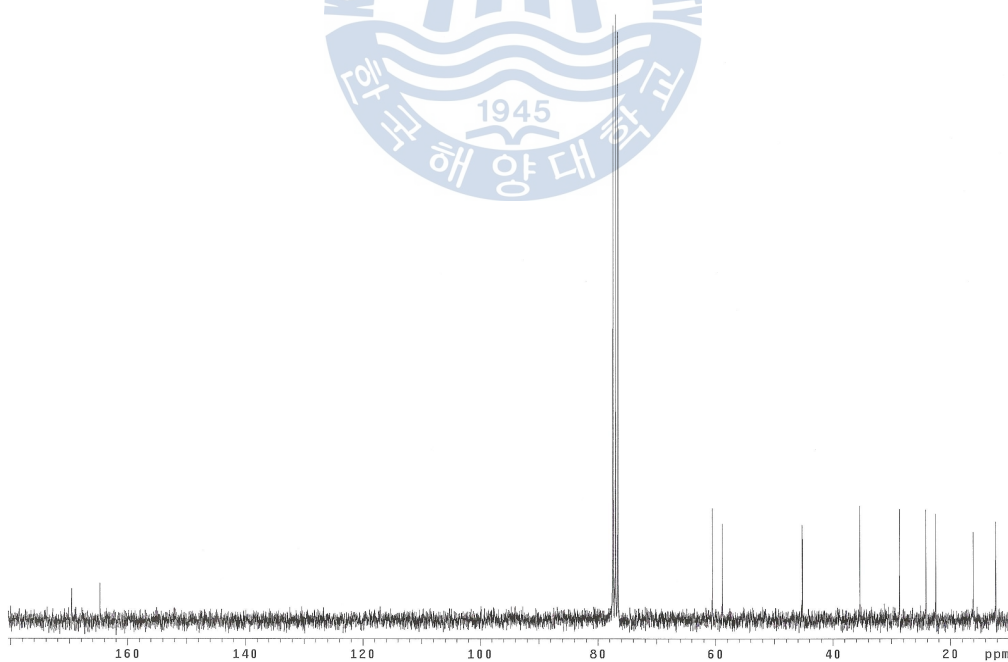


Fig. 29. ^{13}C NMR spectrum of compound **5** in CDCl_3 .

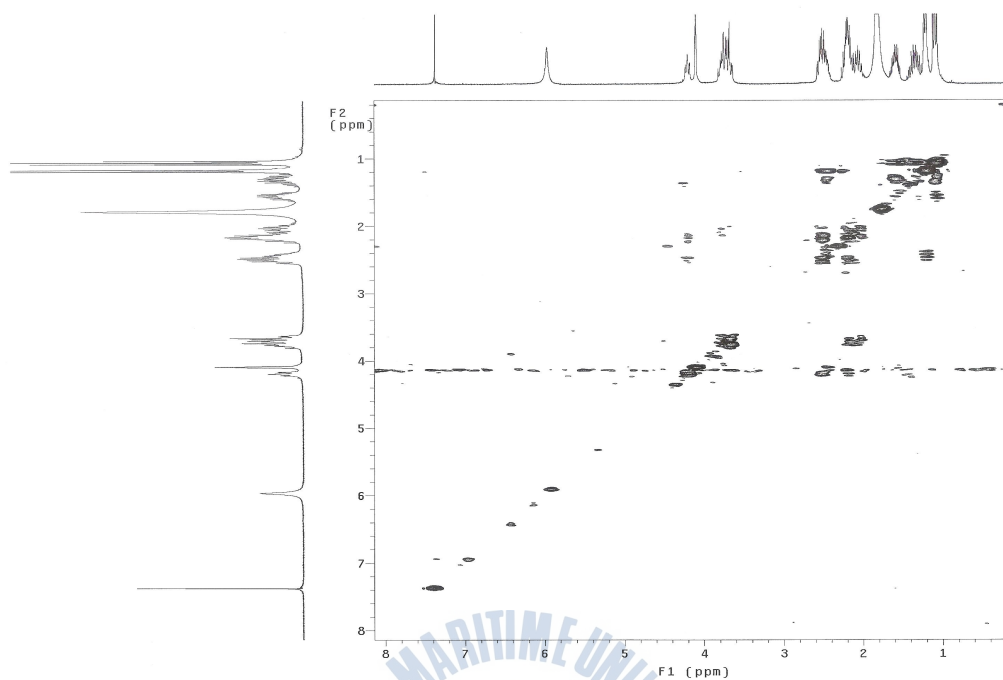


Fig. 30. ^1H COSY spectrum of compound 5

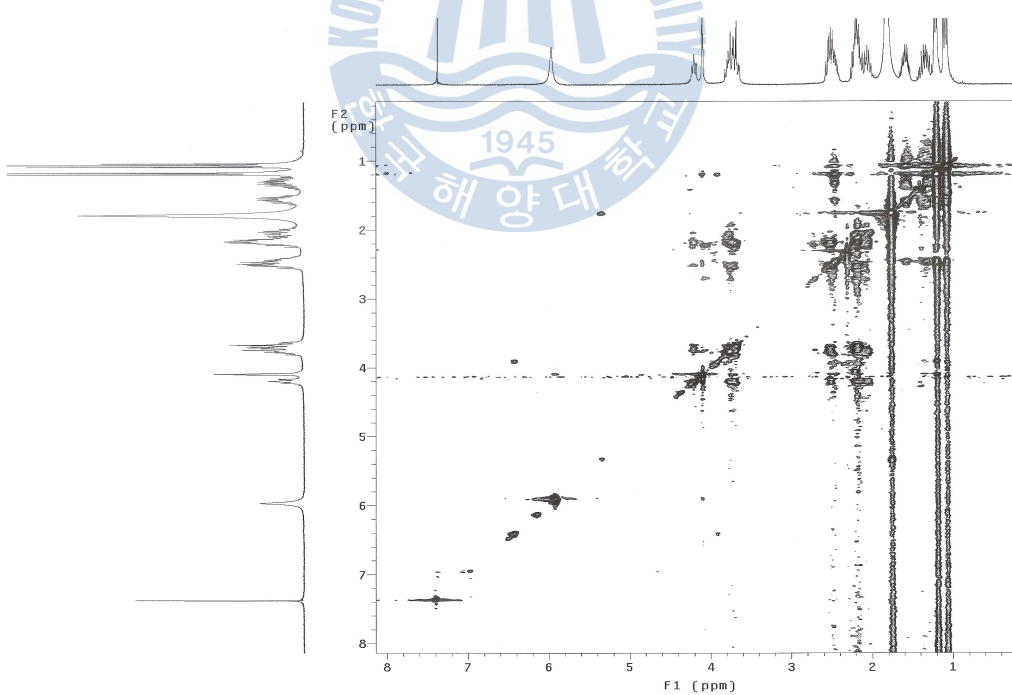


Fig. 31. TOCSY spectrum of compound 5

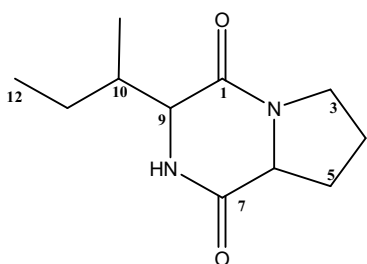


Table 6. ^1H and ^{13}C NMR spectral data for cyclo (L-Pro-L-Ile) (**5**).

position	δ_{H} (H, m, Hz)	δ_{C}
1		169.6
2		
3	3.55 (2H, m)	45.2
4	2.02 (1H, m), 1.90 (1H, m)	22.4
5	2.30 (1H, m), 2.04 (1H, m)	28.6
6	4.07 (1H, t, 8.1)	58.5
7		164.8
8	5.75? (1H, NH)	
9	3.96 (1H, br s)	60.5
10	2.36 (1H, m)	35.3
11	1.43 (1H, m), 1.19 (1H, m)	24.1
12	0.93 (1H, d, 7.2)	12.2
10-Me	1.05 (1H, d, 7.2)	16.1

Measured in CDCl_3 at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ^1H COSY, TOCSY, gHMQC, and gHMBC experiments.

3.2.2 항산화 활성 실험

3.2.2.1 ESR을 이용한 DPPH radical 소거 활성 실험

Radical을 가진 DPPH를 이용하여 compound의 radical 소거 능력을 측정하였으며 시료를 첨가하지 않은 control과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다. 분리한 5개의 compound를 각각 2, 1, 0.5 mM 농도로 실험을 하였다.

Compound 2 는 2 mM 농도에서 53%의 소거율을 보였고, 그 외의 compound 들은 20%에 미치지 못하는 소거율을 보였다.

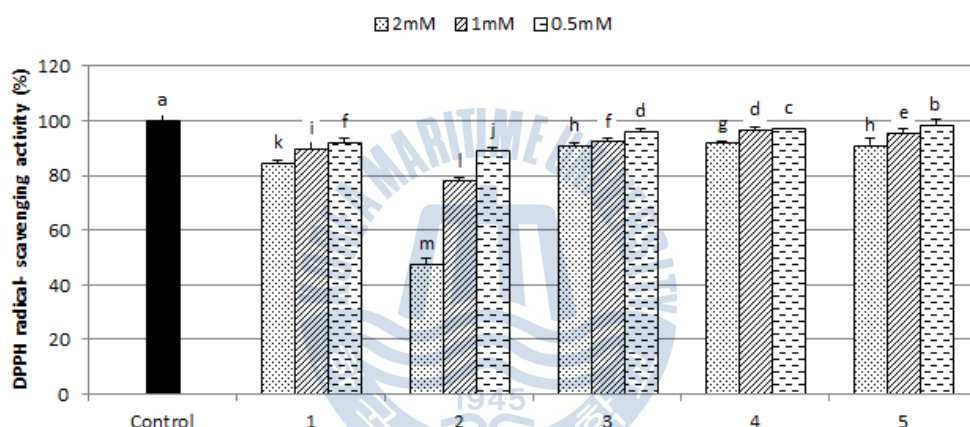


Fig. 32. DPPH radical scavenging effect of compounds 1-5 (% of control).

^{a-m} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.2.2.2 ESR을 이용한 hydroxyl radical 소거 활성 실험

Fenton reaction으로 발생한 hydroxyl radical과 DMPO를 이용하여 radical 소거율을 측정하였다.

Compounds 1, 2 의 경우 각 농도에서 각 각 98%, 94%, 75%와 98%, 94%, 77%로 모든 농도에서 70% 이상의 소거율을 보였다. compound 3, 4, 5 의 경우 2mM 농도에서 각각 64%, 61%, 68%의 소거율을 보였다.

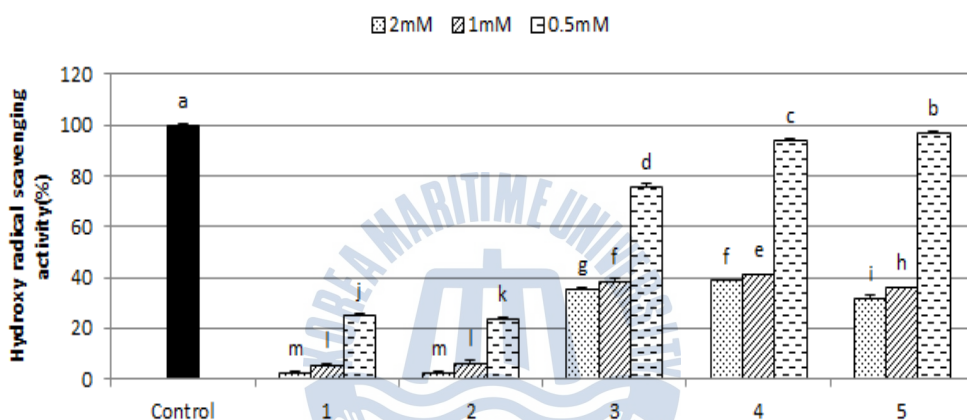


Fig. 33. Hydroxyl radical scavenging effect of compounds 1-5 (% of control). ^{a-m} Means with the different letters are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.2.2.3 ESR을 이용한 superoxide radical 소거 활성 실험

Superoxide radical 소거활성 실험은 riboflavin에 365 nm의 파장을 비춰주어서 발생하는 superoxide radical과 DMPO를 이용하여 측정하였다.

2mM 농도에서 각각 80%, 36%, 45%, 51%, 40%의 소거율을 보였으며 compound 1의 경우에는 1 mM 과 0.5 mM 농도에서도 79%, 77%의 소거율을 보였다.

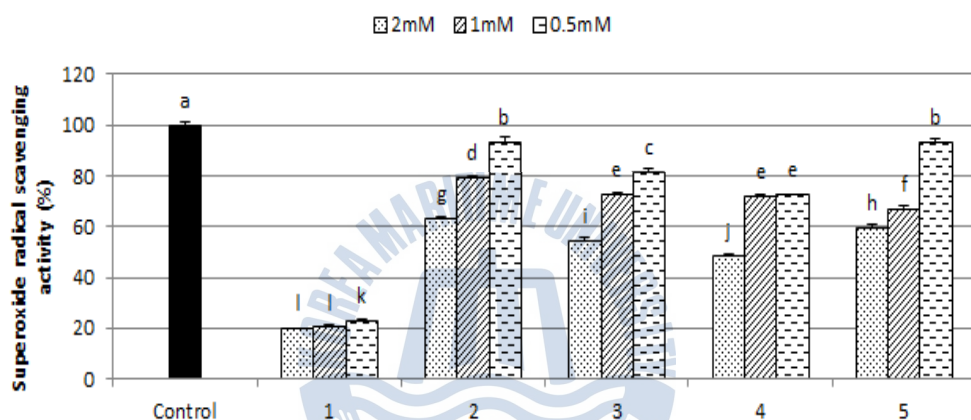


Fig. 34. Superoxide radical scavenging effect of compounds 1-5 (% of control). ^{a-l} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.2.2.4 peroxynitrite 소거 활성 실험

형광물질인 DHR 123을 이용하여 ONOO^- 소거 활성을 검색하였으며, 시료를 첨가하지 않은 control과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다. 분리한 5개의 compound를 각각 500, 250, 100, 50 μM 의 농도에서 SIN-1과 authentic peroxynitrite의 소거율을 탐색하였으며, 대조군으로는 500, 250, 100, 50 μM L-ascorbic acid 와 penicillamine을 사용하였다.

먼저 authentic peroxynitrite에 대한 소거 활성을 측정한 결과 authentic peroxynitrite를 처리하지 않은 control과 비교하여 모든 시료에서 peroxynitrite 소거효과를 나타냈으며, 그 중에서도 특히 compounds **1**, **2** 가 가장 큰 소거효과를 가졌으며 500, 250, 100, 50 μM 의 농도에서 각각 62%, 53%, 34%, 32% 그리고 72%, 58%, 46%, 24%의 소거율을 보였다. 모든 시료가 vitamin C와 penicillamine의 소거능력에는 미치지 못하였다(Fig. 35.).



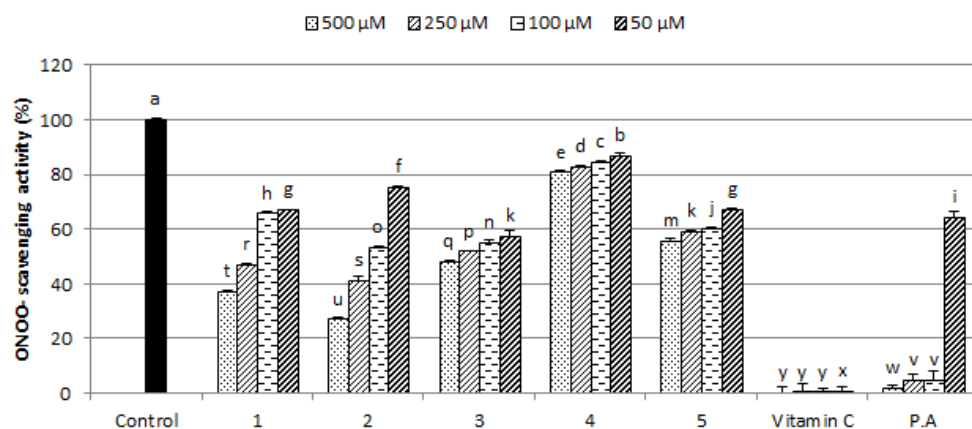


Fig. 35. Scavenging activity of compounds **1-5** on authentic ONOO^- (% of control). ^{a-y} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



3.2.2.5 SIN-1 으로부터 유도된 peroxynitrite 소거 활성

SIN-1으로부터 유도된 ONOO^- 소거결과에도 각각의 농도 500, 250, 100, 50 μM 에서 모든 시료가 SIN-1을 처리하지 않은 control보다 높은 소거 활성이 나타났다. 가장 큰 소거 효과를 보인 시료는 compound 1 이며 각 농도에서 91%, 90%, 86%, 81%의 소거율을 보였다. 다음으로 compound 3 이 효과가 좋았으며 각 농도에서 77%, 73%, 67%, 59%의 소거율을 보였다. 이 외에도 compound 2 의 소거 활성이 좋았으며 500 μM 농도에서 74%의 소거율을 보였다. Compound 5 를 제외한 모든 compound에서 500 μM 의 농도에서 50% 이상의 소거율을 보였지만 compound 1 를 제외한 다른 시료들을 대조군인 Vitamin C 와 비교하여 ONOO^- 소거활성이 미치지 못하였다.



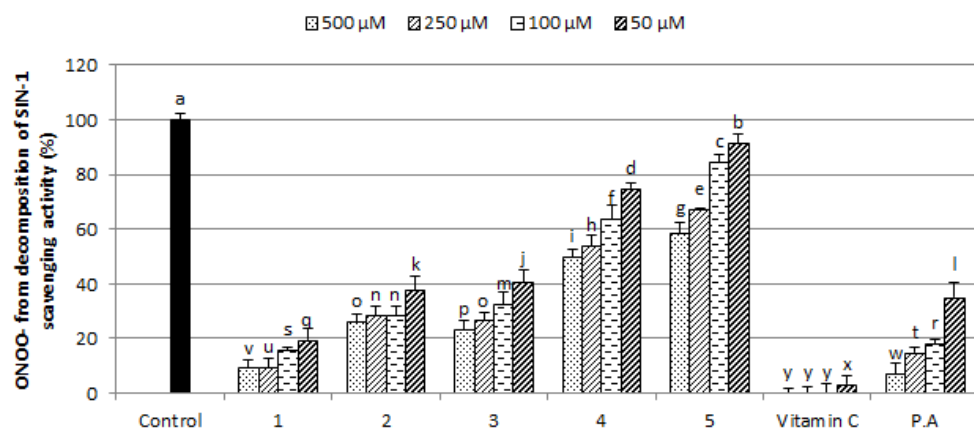


Fig. 36. Scavenging activity of compounds 1-5 on ONOO^- from SIN-1 (% of control). ^{a-y} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



3.2.3 세포 수준에서의 활성 실험

3.2.3.1 ROS 측정

세포내 활성 산소와 반응하여 형광물질을 만들어 내는 DCFH-DA를 사용해 세포내 존재하는 활성 산소종을 DCF fluorescence로 측정하였다. 500 μ M의 H_2O_2 로 처리한 후 0, 30, 60, 90, 120분마다 활성을 측정하여 활성을 측정하였다. 모든 compound들은 각각 500, 250, 100, 50 μ M의 농도로 측정하였으며, 대조군으로는 시료를 넣지 않고 H_2O_2 를 처리한 control과 시료와 H_2O_2 를 모두 처리하지 않은 blank를 사용하여 비교하였다. H_2O_2 를 처리한 well에서는 시간에 따라 DCF fluorescence 값이 급격히 증가하였으며, H_2O_2 를 처리하지 않은 blank는 시간에 따른 DCF fluorescence 값의 변화가 거의 없었다.

Compound 1, 2, 5의 경우 ROS 소거활성이 조금 나타났지만 농도에 따른 차이는 크게 나타나지 않았다. 그리고 compound 3, 4는 ROS 소거 능력이 거의 나타나지 않았다.



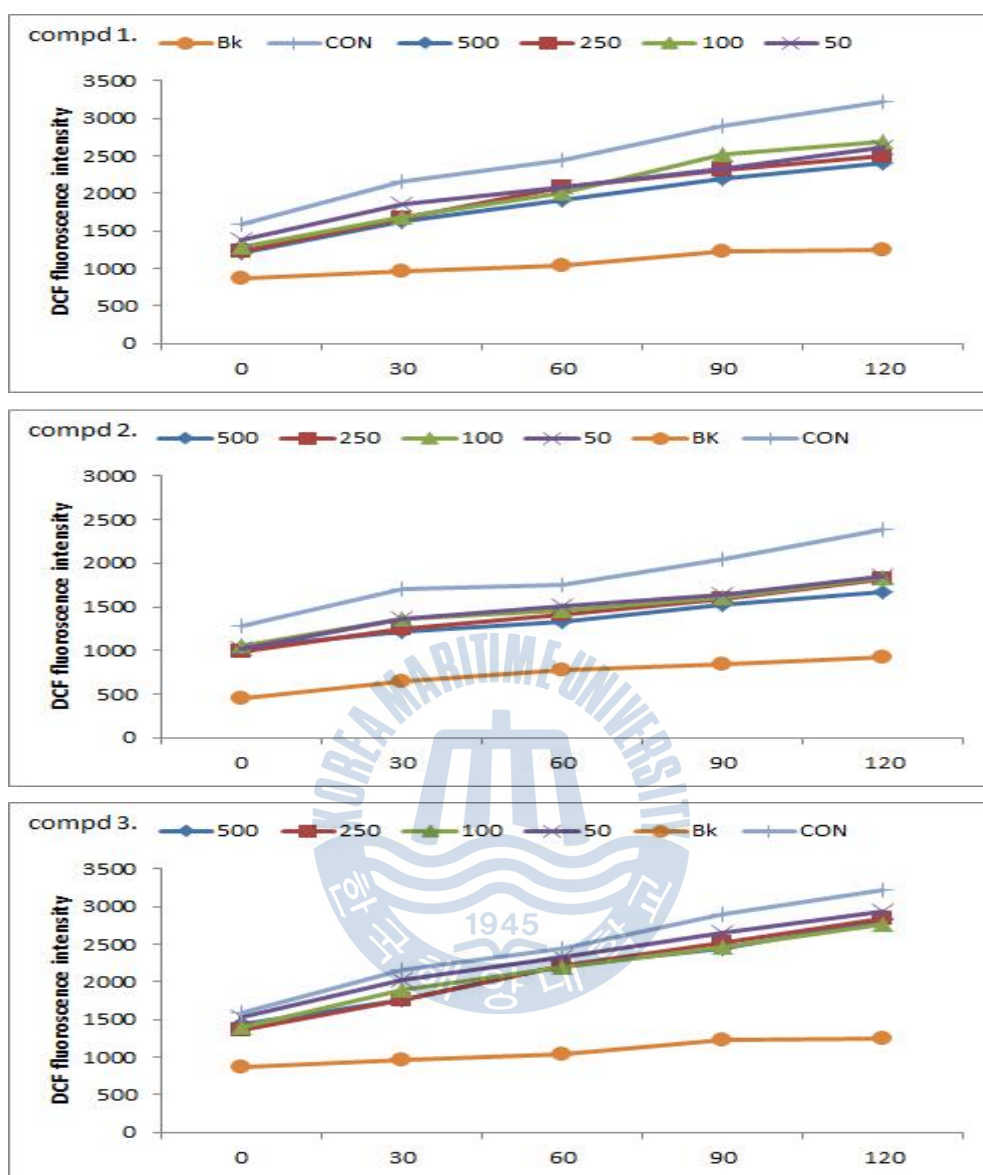


Fig. 37. Inhibition effect of compounds **1-3** on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.

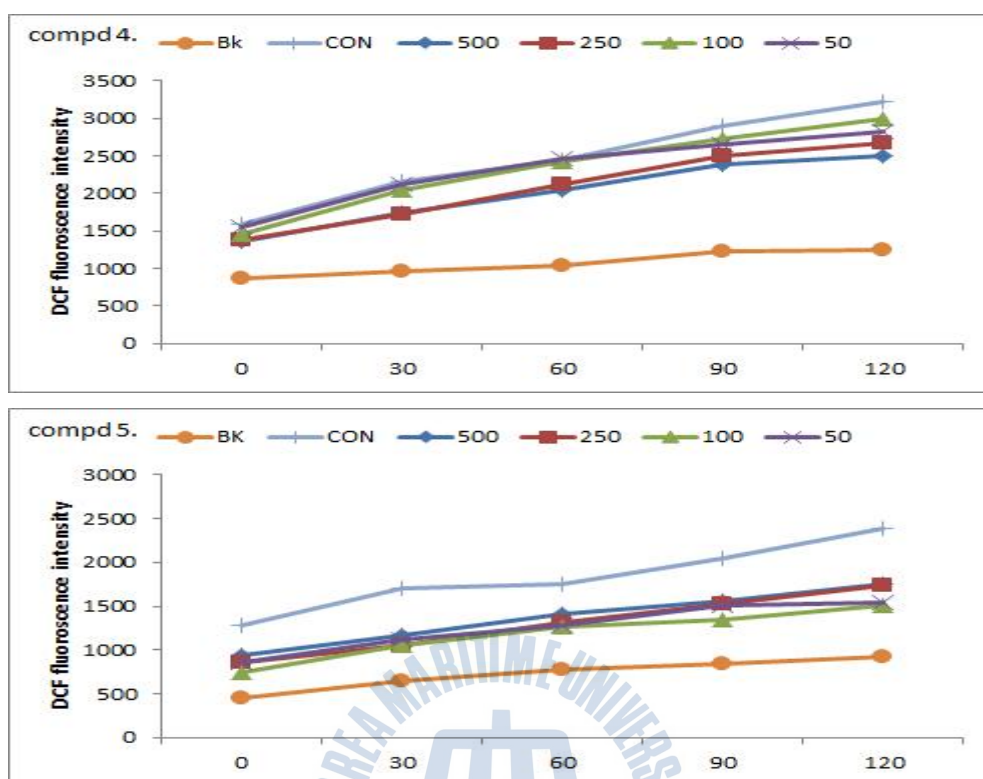


Fig. 38. Inhibition effect of compounds 4 and 5 on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.

3.2.3.2 MTT assay

3.2.3.2.1 HT-29 세포에서의 MTT 실험

대장암 세포 HT-29를 이용하여 각 시료의 500, 250, 100, 50 μ M의 농도에서 24시간 처리 후 암세포에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. Compounds 1-5 는 500 μ M농도에서 20%에 못 미치는 암세포 증식 억제율을 보였으며 각각 11%, 1%, 12%, 22%, 2%의 증식 억제율을 보였다.

3.2.3.2.2 AGS 세포에서의 MTT 실험

위암 세포인 AGS를 이용하여 각 시료의 500, 250, 100, 50 μ M의 농도에서 24시간 후 암세포에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. Compounds 1-5 는 500 μ M 농도에서 40%에 가까운 암세포 증식 억제율을 보였으며 각각 33%, 41%, 38%, 41%, 44%의 증식 억제율을 보였다.

3.2.3.2.3 MCF-7 세포에서의 MTT 실험

유방암 세포인 MCF-7을 이용하여 각 시료의 500, 250, 100, 50 μ M의 농도에서 24시간 후 암세포에 미치는 영향을 조사하였다. Compounds 1-5 는 500 μ M 농도에서 40%에 가까운 증식 억제율을 보였으며 각각 26%, 36%, 31%, 39%, 25%의 증식 억제율을 보였다.

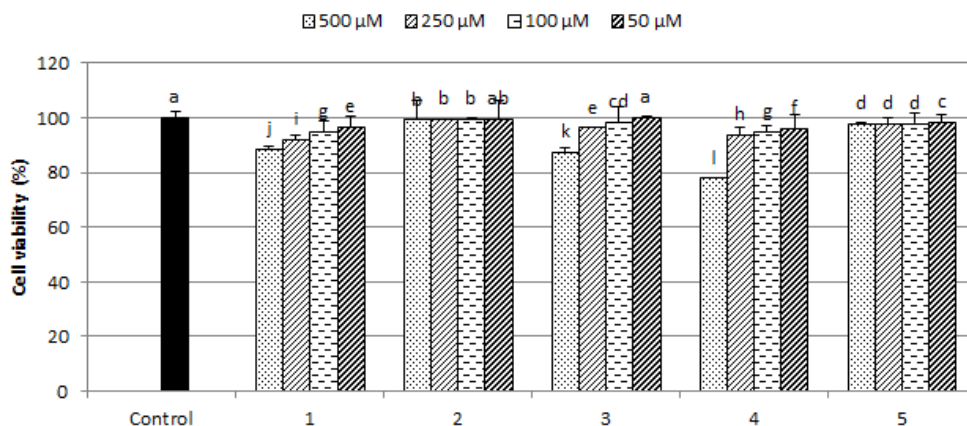


Fig. 39. Effects of crude extract and compounds **1-5** on HT-29 cell viability by MTT assay after 24 hrs. ^{a-l} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

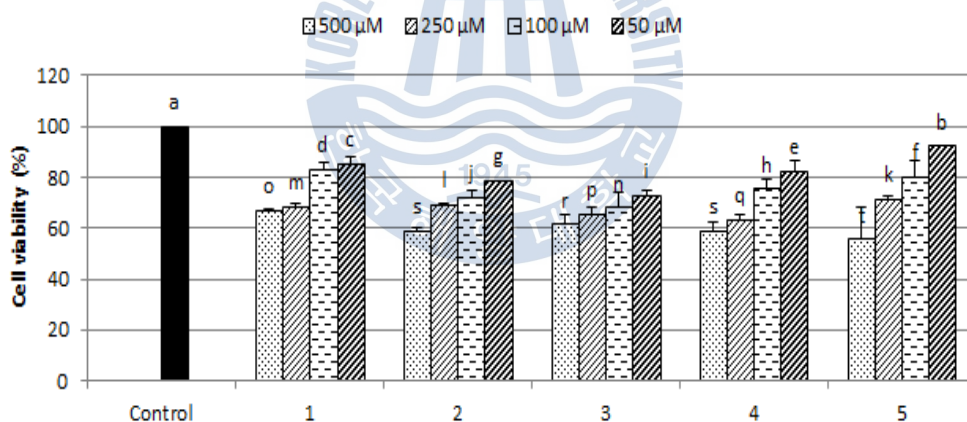


Fig. 40. Effects of crude extract and compounds **1-5** on AGS cell viability by MTT assay after 24 hrs. ^{a-s} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

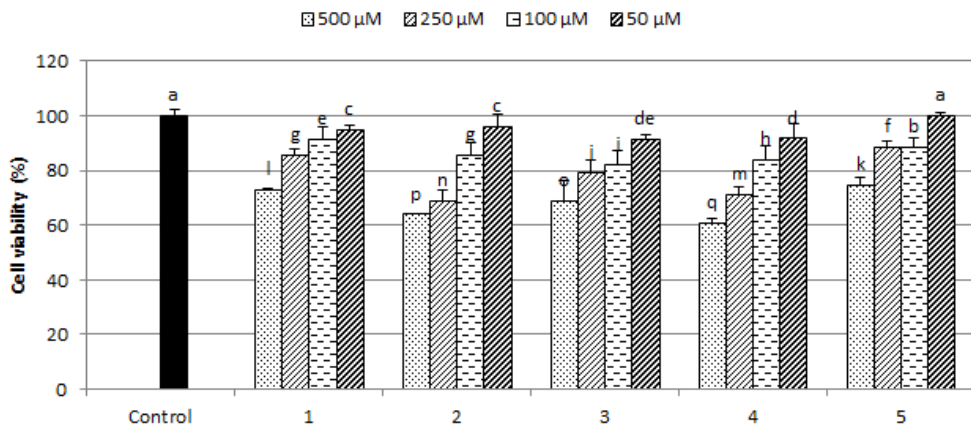


Fig. 41. Effects of crude extract and compounds **1-5** on MCF-7 cell viability by MTT assay after 24 hrs. ^{a-q} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



3.2.3.3 NO 생성 억제 효과

NO의 기질인 L-arginine은 L-Citrulline과 NO로 변하는데, 이는 빠른 속도로 안정화된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. Griess 시약은 아질산염과 화학 반응하여 분홍색의 아조염을 형성하고 이것은 NO의 농도와 일치하기 때문에 이를 흡광도 540 nm에서 측정하였다. 모든 compound들을 각각 500, 250, 100, 50 μ M의 농도로 처리하여 측정하였으며, 대조군으로는 compound를 넣지 않고 1 μ g/mL LPS로 처리한 control과 compound와 LPS 모두 다 처리하지 않은 blank를 이용하여 값을 비교하였다.

NO의 생성을 측정한 결과 LPS로 자극한 control과 비교하였을 때, Compound 2가 NO 생성 억제 효과가 좋았다. Compound 2의 경우 500 μ M의 농도에서 96%의 억제 효과를 보였으며 다른 농도에서도 NO를 억제효과가 나타났다. Compound 2를 제외한 나머지 compound에서는 NO를 억제하는 능력이 다소 떨어졌다.



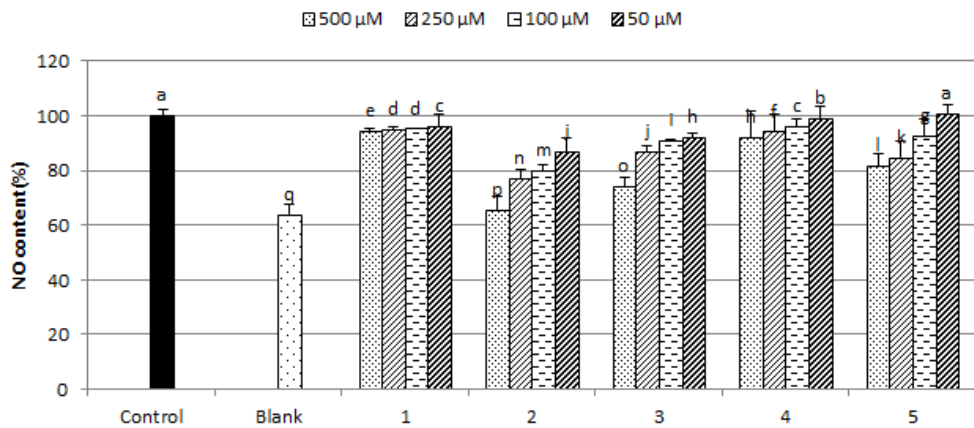
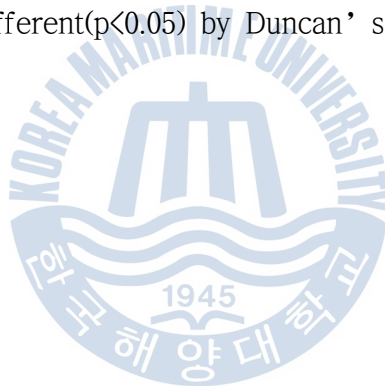


Fig. 42. Inhibition effects of compounds 1-5 on nitric oxide production in Raw 264.7 cells. ^{a-q} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



3.3 2,5-Diketopiperazine 유도체들의 합성과 활성검색

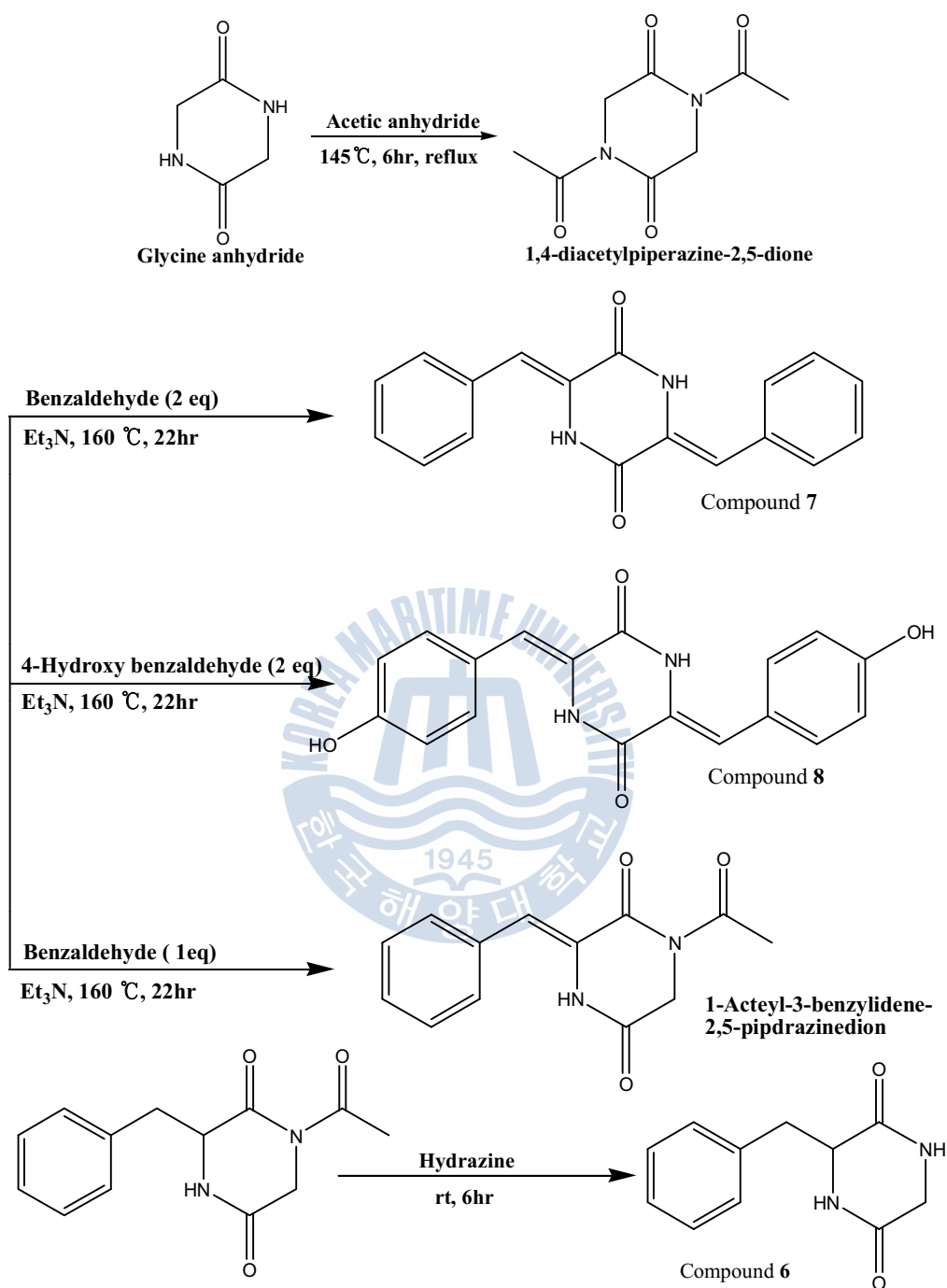
3.3.1 합성방법

3.3.1.1 Compounds 6, 7, 8 의 합성

Compound **6**: Glycine anhydride 1 g을 acetic anhydride 5 mL에 넣어 145℃, 6시간 reflux를 하여 1,4-diacetylpiperazine-2,5-dione을 얻었다. 이렇게 얻어진 1,4-diacetylpiperazine-2,5-dione 용액에 존재하는 과량의 acetic anhydride를 제거한 후에 남은 잔류물에 benzaldehyde 0.32 g, DMF 5 mL, Et₃N 0.55 mL를 넣고 160℃에서 22시간 reflux 한 후에 실온으로 냉각시키고 ethyl acetate를 100mL 첨가하여 석출시켜 1-acetyl-3-benzylidene-piperazine-2,5-dione 430 mg을 얻었다. 이렇게 얻어진 1-acetyl-3-benzylidene-piperazine-2,5-dione 100 mg과 hydrazine 5 mL를 넣고 실온에서 6 시간 반응시킨 후 반응 혼합물에 0.001M HCl을 넣고 EtOAc로 분획하여 EtOAc층을 농축하면 compound **6** 54.1 mg 얻어 졌다.

Compound **7**: Glycine anhydride 1 g을 acetic anhydride 5 mL에 넣어 145℃, 6시간 reflux를 하여 1,4-diacetylpiperazine-2,5-dione을 얻었다. 이렇게 얻어진 1,4-diacetylpiperazine-2,5-dione 용액에 존재하는 과량의 acetic anhydride를 제거한 후에 남은 잔류물에 benzaldehyde 0.68 g, DMF 5 mL, Et₃N 1.1 mL를 넣고 160℃에서 22시간 reflux를 한 후에 실온으로 냉각시키고 ethyl acetate를 100ml 첨가하여 석출시켜 compound **7** 을 540 mg 얻었다.

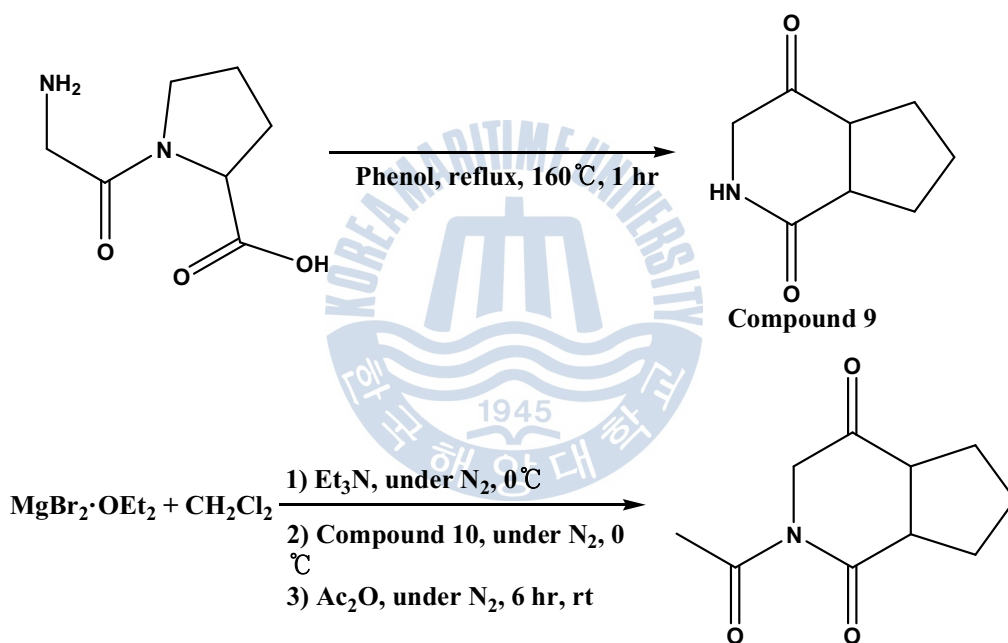
Compound **8**: 반응물을 benzaldehyde 대신에 4-hydroxybenzaldehyde를 사용한 것을 제외하고는 compound **7** 과 동일한 방법으로 합성하였으며 glycine anhydride 1 g, 4-hydroxybenzaldehyde 700 mg을 사용하여 compound **8** 을 470 mg 얻었다.



Scheme 6. Synthesis of compounds 6-8.

3.3.1.2 compound 9, 10 의 합성

H-Gly-Pro-OH(1 g)에 phenol(5 mL)을 넣고 160℃에서 1 시간 reflux하여 나온 반응물을 농축하여 HPLC(ODS-A, 50% aq.MeOH, 2 mL/min)로 분리하여 compound 9 (720 mg)을 얻었다. Compound 10 을 합성하기 위해 질소 대기하에서 $\text{MgBr} \cdot \text{OEt}_2$ 529.7 mg을 CH_2Cl_2 에 녹인 후 Et_3N 286 μL 를 넣고 0℃에서 compound 9 을 105.3 mg 첨가하여 5 분 동안 저어 준다. 그 후 acetic anhydride 129 μL 를 첨가하여 실온에서 6 시간 반응시키고 얻어진 반응혼합물을 농축하여 HPLC(ODS-A, 50% aq.MeOH, 2 mL/min)로 분리하였다.



Scheme 7. Synthesis of compounds 9 and 10.

3.3.2 합성 유도체의 NMR spectrum.

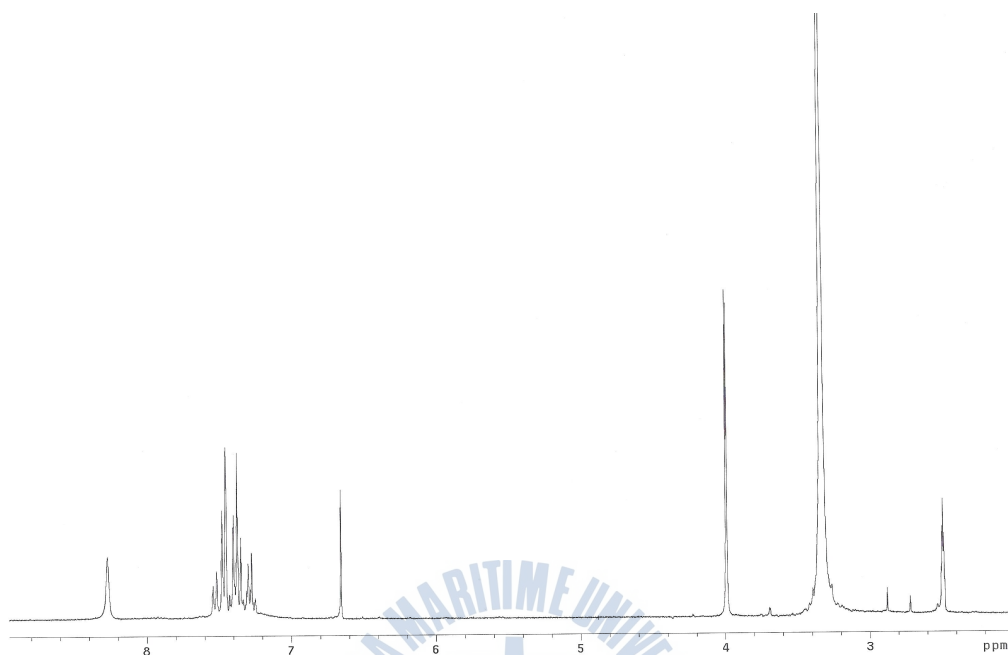


Fig. 43. ^1H NMR spectrum of compound **6** in DMSO.

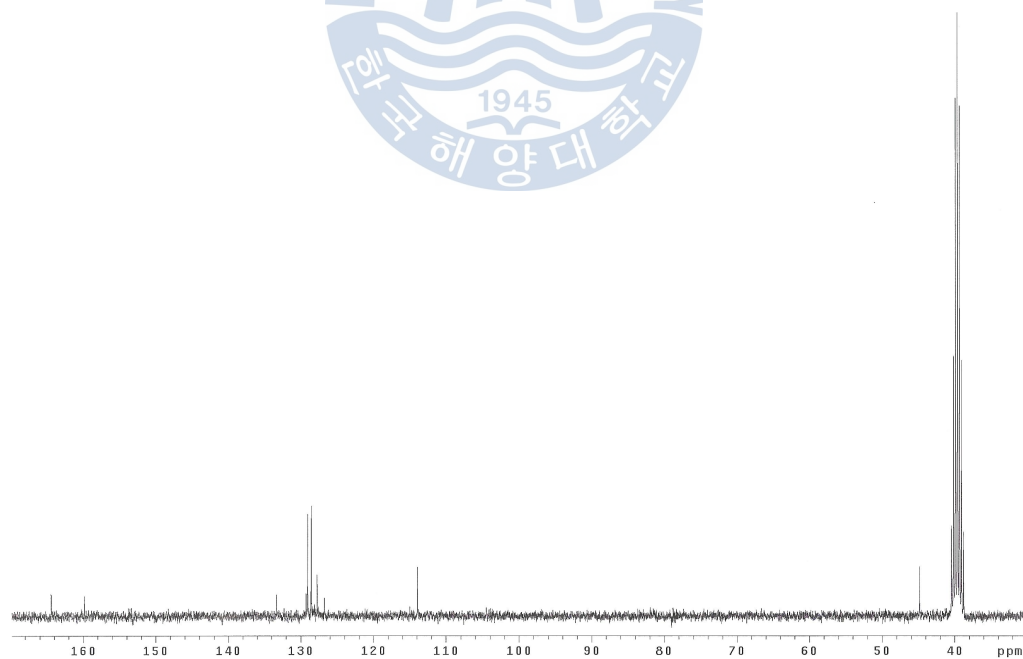


Fig. 44. ^{13}C NMR spectrum of compound **6** in DMSO.

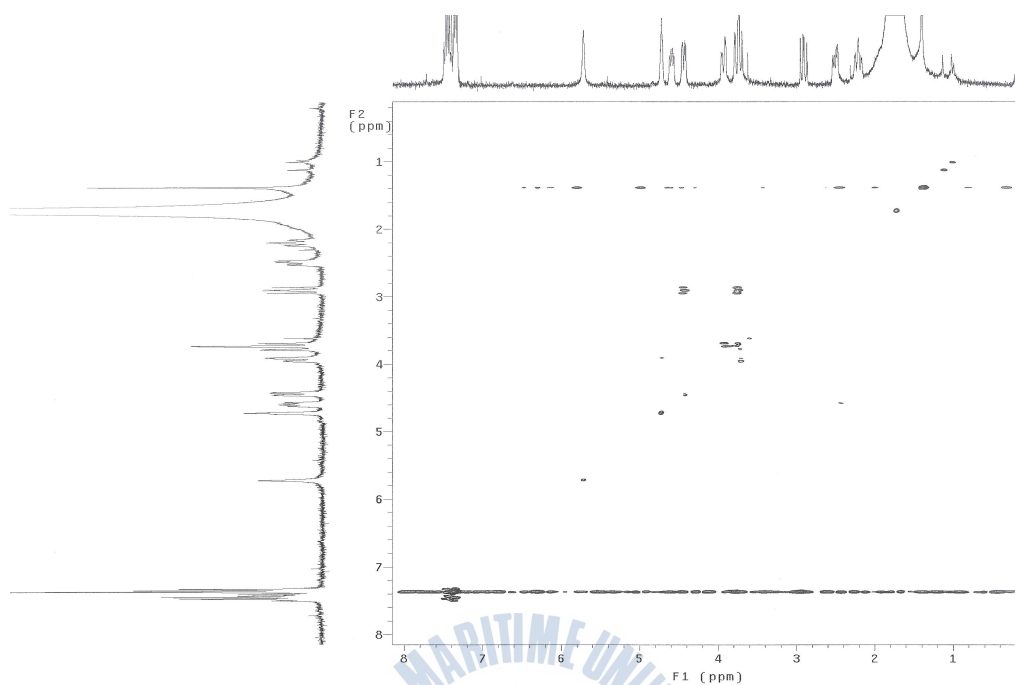


Fig. 45. ^1H COSY spectrum of compound **6** in DMSO.

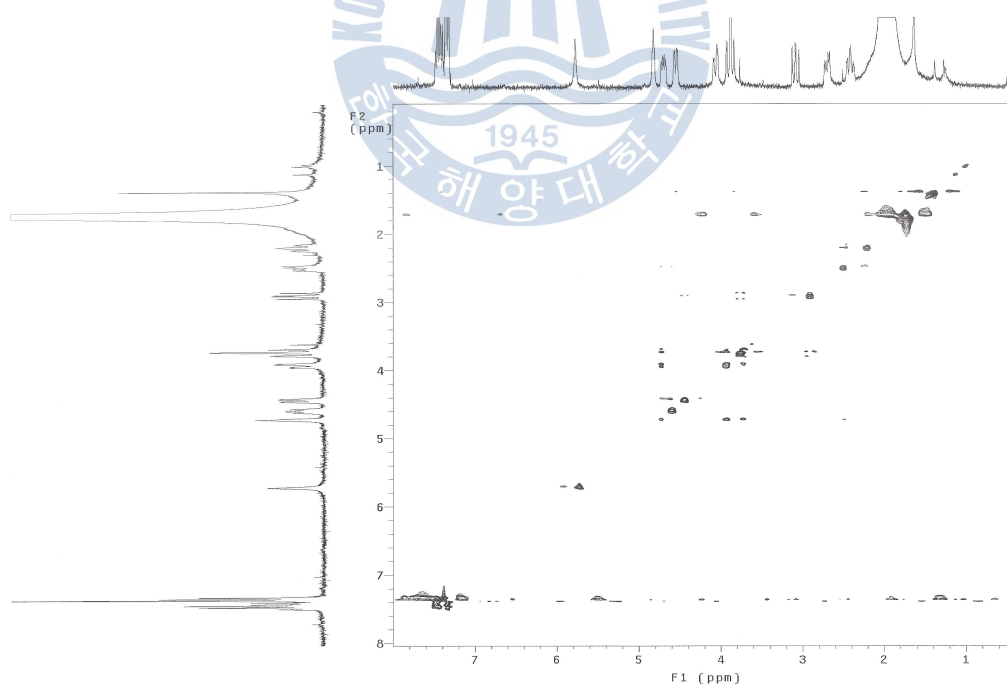


Fig. 46. TOCSY spectrum of compound **6** in DMSO.

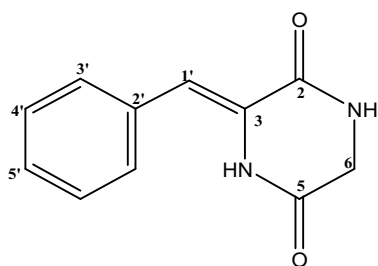


Table 7. ^1H and ^{13}C NMR spectral data for 3-benzylidene-2,5-piperazinedione (**6**).

position	δ_{H} (H, m, Hz)	δ_{C}
1		
2		159.9
3		133.3
4		
5		164.4
6	3.99 (2H, d, 2.0)	44.8
1'	6.66 (1H)	113.9
2'		129.1
3'	7.56–7.44 (2H, m)	128.6
4'	7.40–7.24 (3H, m)	127.9
5'	7.40–7.24 (3H, m)	126.9

Measured in CDCl_3 at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ^1H COSY, TOCSY, gHMBC, and gHMBC experiments.

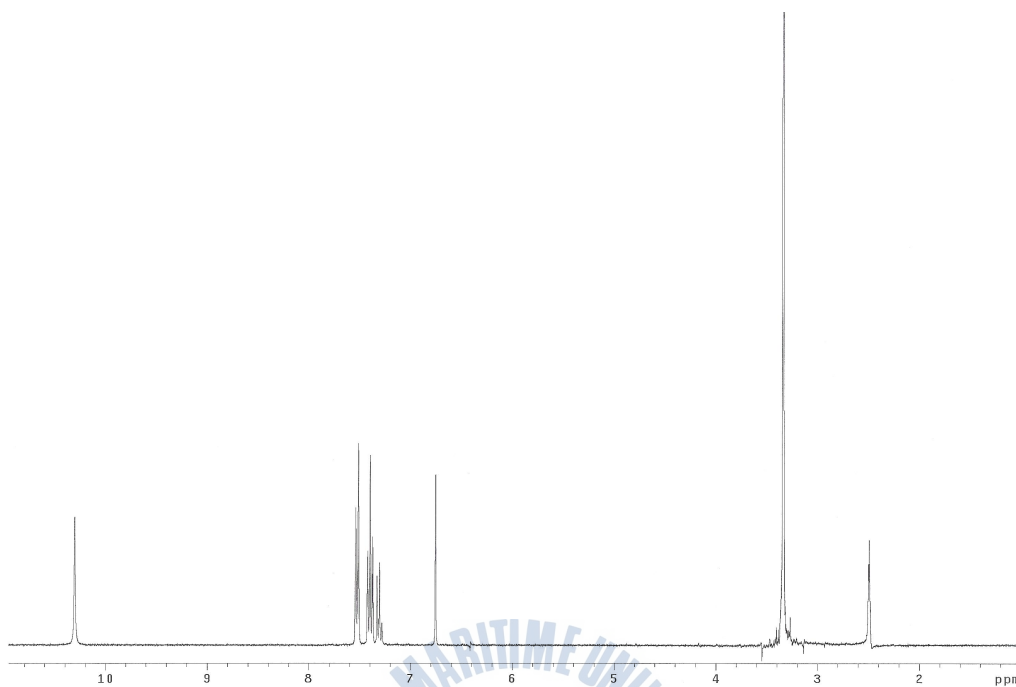


Fig. 47. ^1H NMR spectrum of compound **7** in DMSO.

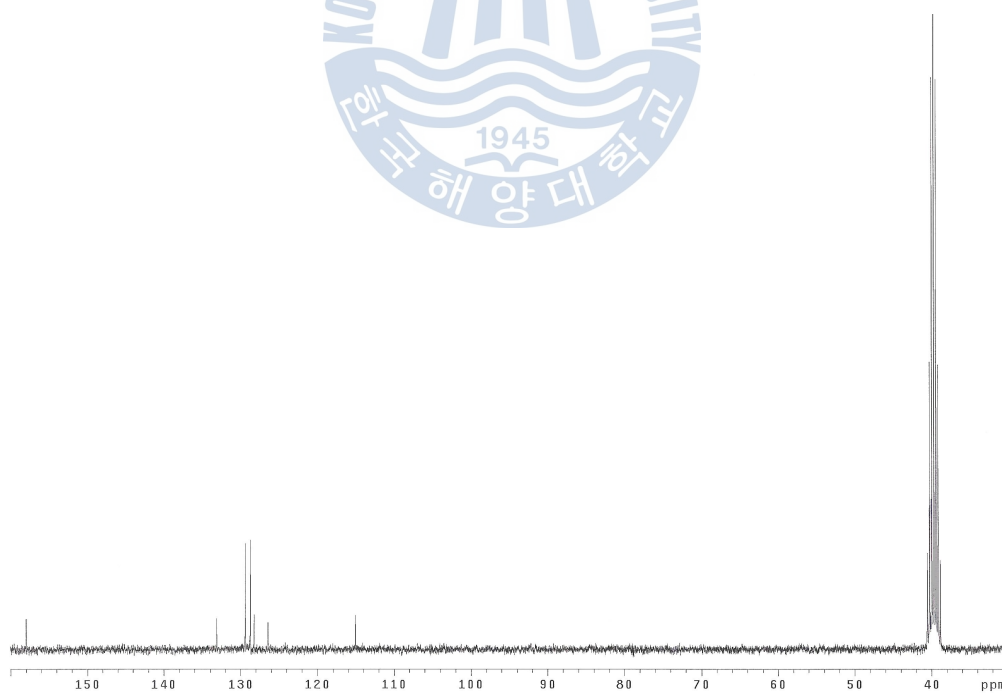


Fig. 48. ^{13}C NMR spectrum of compound **7** in DMSO.

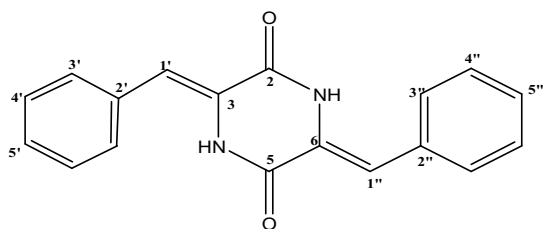


Table 8. ^1H and ^{13}C NMR spectral data for 3,6-dibenzylidene-2,5-piperazinedione (7).

position	δ_{H} (H, m, Hz)	δ_{C}
1		
2		158.0
3		115.1
4		
5		158.0
6		115.1
1'	6.75 (1H)	131.1
2'		128.2
3'	7.52 (2H, d, 7.4)	129.4
4'	7.40 (2H, t, 7.4)	128.7
5'	7.31 (2H, m)	126.4
1''	6.75 (1H)	131.1
2''		128.2
3''	7.52 (2H, d, 7.4)	129.4
4''	7.40 (2H, t, 7.4)	128.7
5''	7.31 (2H, m)	126.4

Measured in CDCl_3 at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ^1H COSY, TOCSY, gHMBC, and gHMBC experiments.

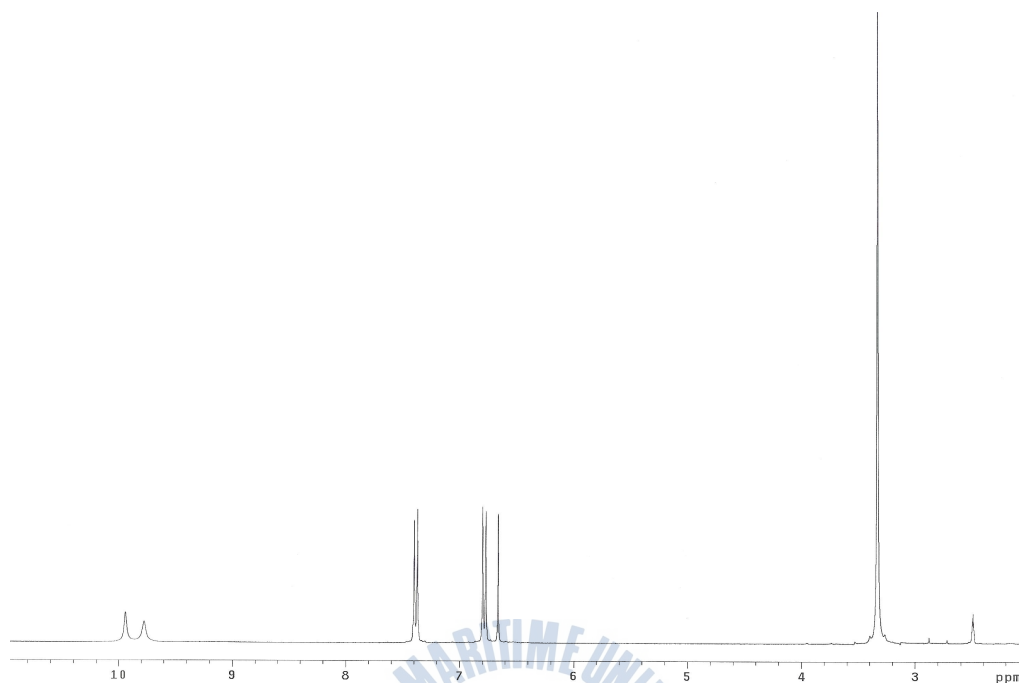


Fig. 49. ^1H NMR spectrum of compound **8** in DMSO.

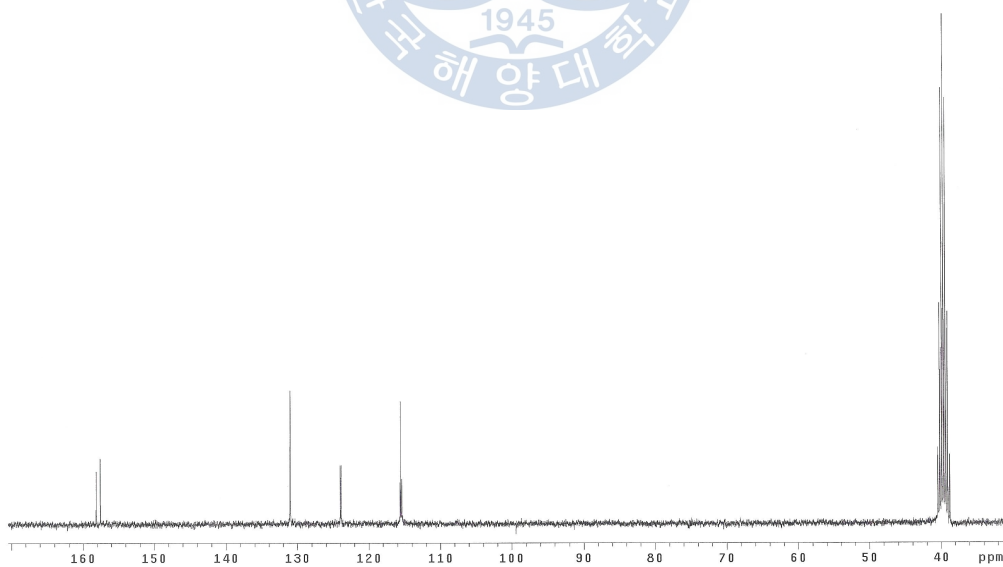


Fig. 50. ^{13}C NMR spectrum of compound **8** in DMSO.

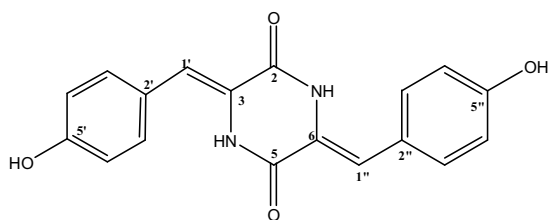


Table 9. ^1H and ^{13}C NMR spectral data for 3,6-(di-4-hydroxybenzylidene)-2,5-piperazinedione (**8**).

position	δ_{H} (H, m, Hz)	δ_{C}
1		
2		158.3
3		124.0
4		
5		158.3
6		124.0
1'	6.66 (1H)	131.1
2'		124.1
3'	7.39 (2H, d, 8.5)	115.7
4'	6.78 (2H, d, 8.5)	115.5
5'		155.7
1''	6.66 (1H)	131.1
2''		124.1
3''	7.39 (2H, d, 8.5)	115.7
4''	6.78 (2H, d, 8.5)	115.5
5''		155.7

Measured in CDCl_3 at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ^1H COSY, TOCSY, gHMBC, and gHMBC experiments.

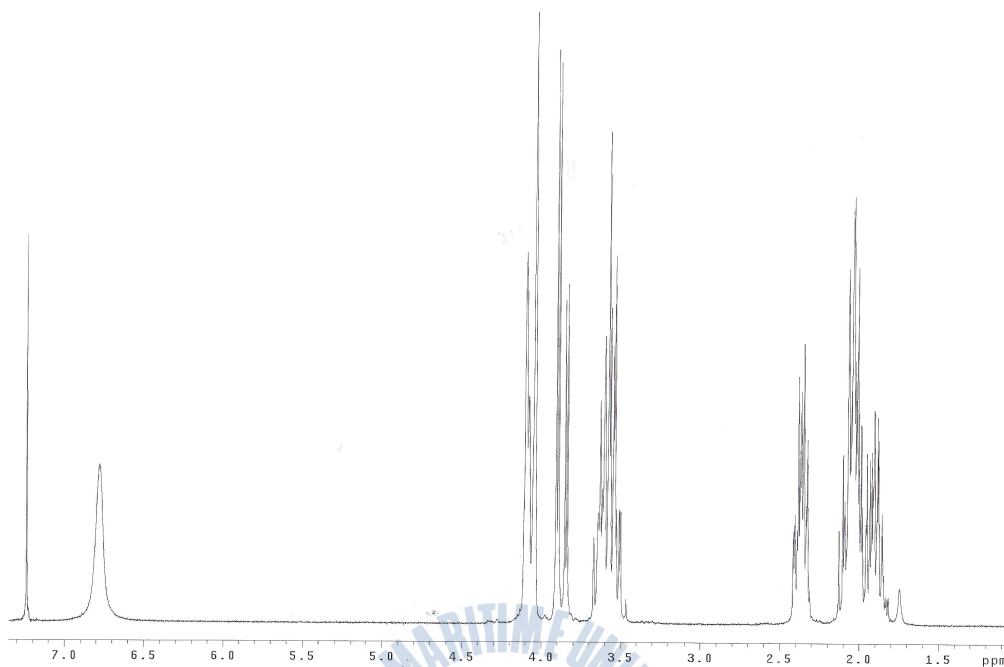


Fig. 51. ^1H NMR spectrum of compound **9** in CDCl_3 .

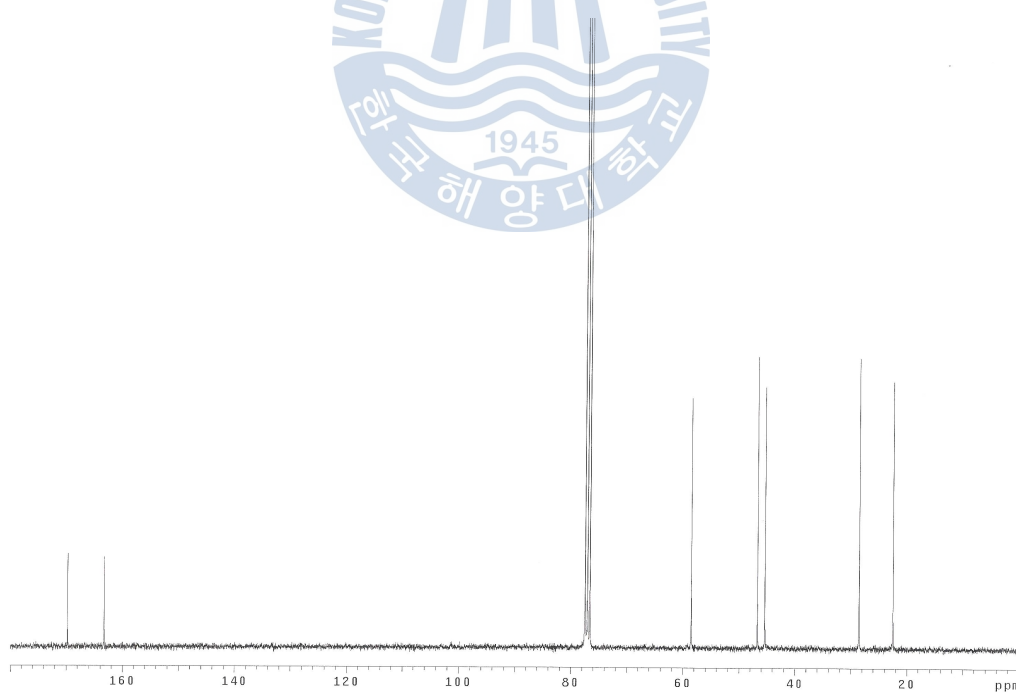


Fig. 52. ^{13}C NMR spectrum of compound **9** in CDCl_3 .

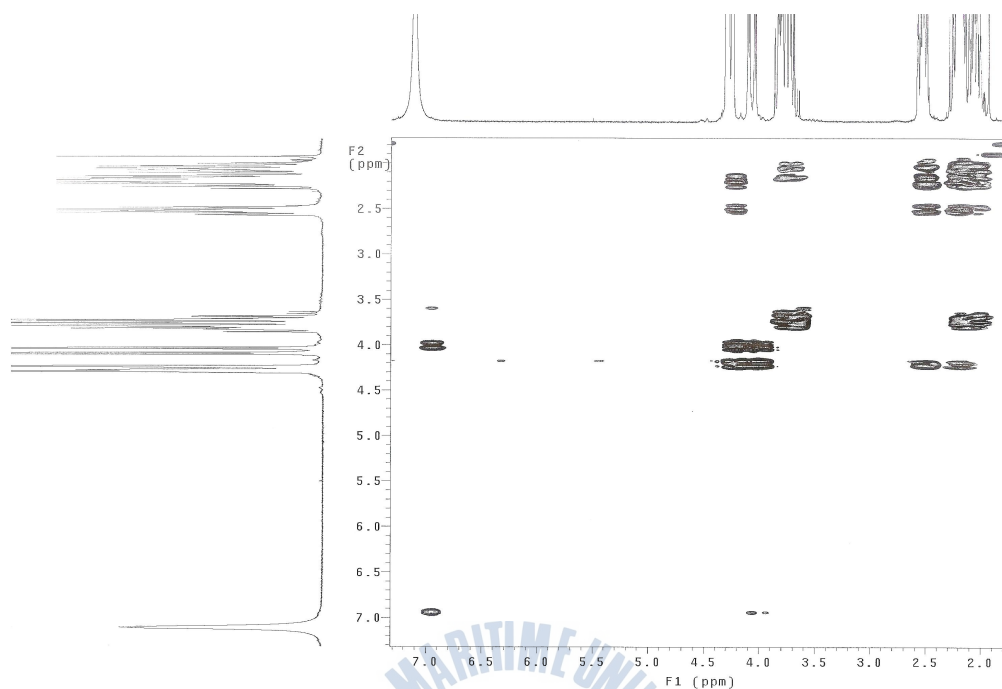


Fig. 53. ^1H COSY spectrum of compound **9** in CDCl_3 .

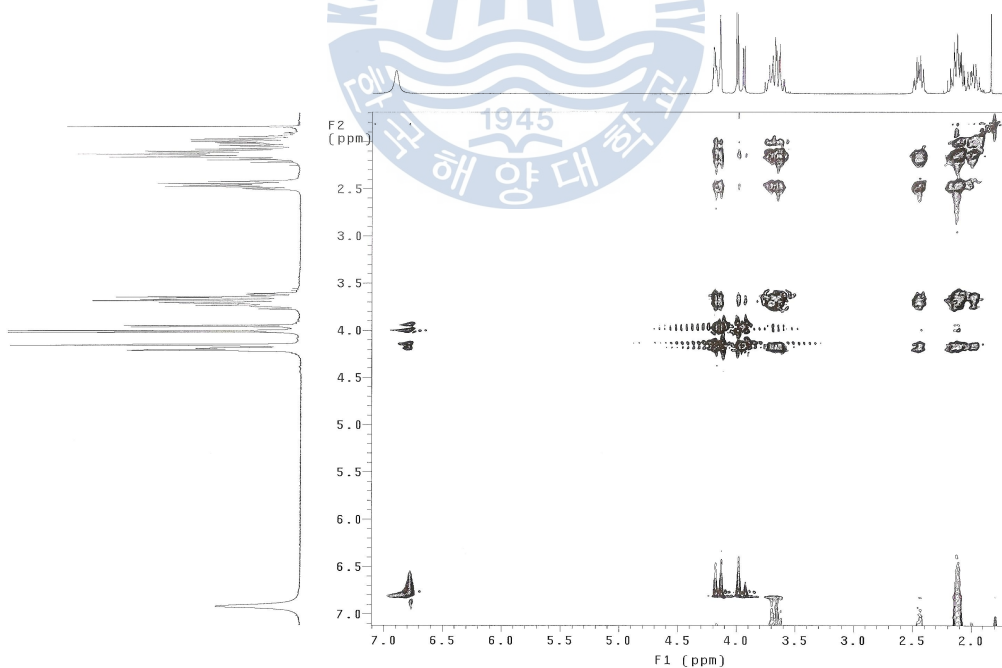


Fig. 54. TOCSY spectrum of compound **9** in CDCl_3 .

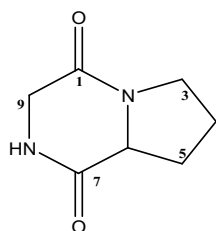


Table 10. ^1H and ^{13}C NMR spectral data for cyclo (L-Pro-Gly) (**9**).

position	δ_{H} (H, m, Hz)	δ_{C}
1		163.3
2		
3	3.58 (2H, m)	45.3
4	2.01 (1H, m), 1.91 (1H, m)	22.5
5	2.36 (1H, m), 2.05 (1H, m)	28.5
6	4.09 (1H, t, 7.2)	58.5
7		169.7
8	6.79 (1H, NH)	
9	4.07 (1H, d, 16.5), 3.88 (1H, dd, 16.5, 4.4)	46.7

Measured in CDCl_3 at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ^1H COSY, TOCSY, gHMQC, and gHMBC experiments.

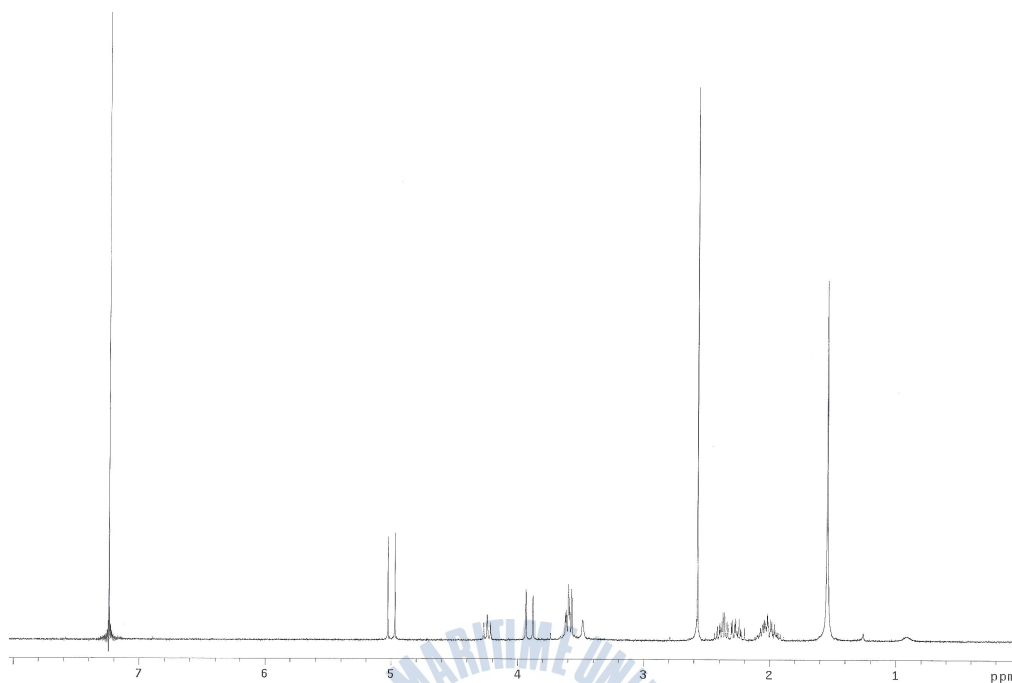


Fig. 55. ^1H NMR spectrum of compound **10** in CDCl_3 .

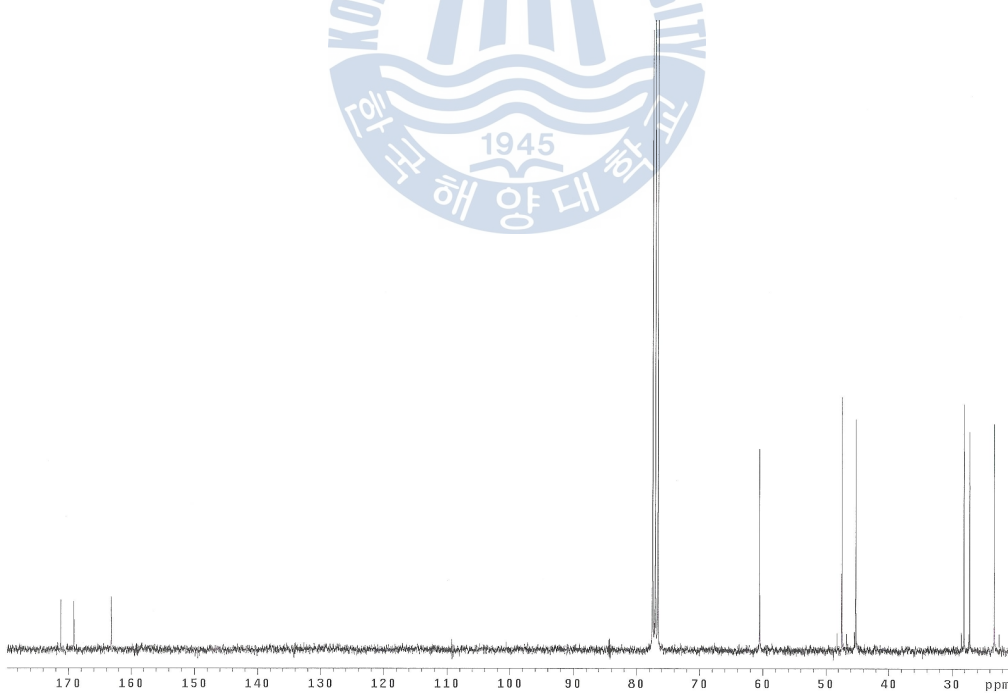


Fig. 56. ^{13}C NMR spectrum of compound **10** in CDCl_3 .

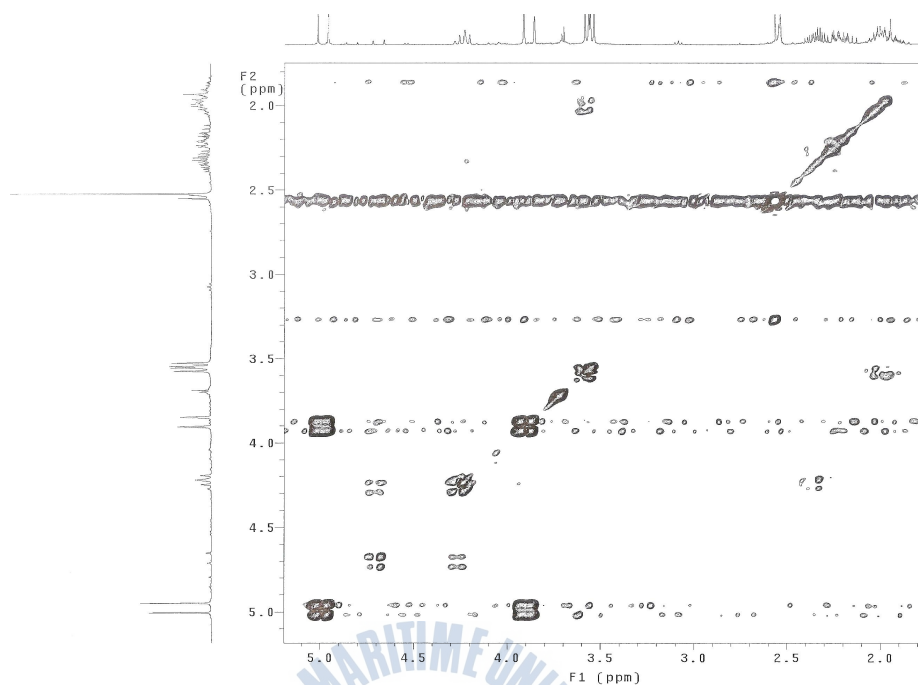


Fig. 57. ^1H COSY spectrum of compound **10** in CDCl_3 .

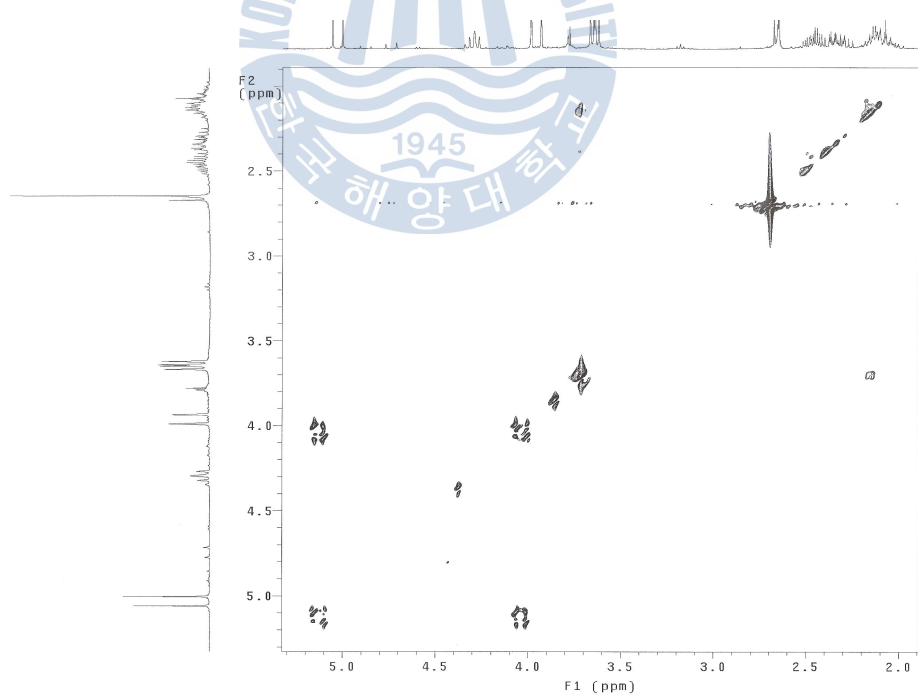


Fig. 58. TOCSY spectrum of compound **10** in CDCl_3 .

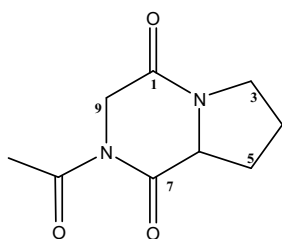


Table 11. ^1H and ^{13}C NMR spectral data for cyclo (L-Pro-Ac-Gly) (**10**).

position	δ_{H} (H, m, Hz)	δ_{C}
1		163.2
2		
3	3.91 (1H, d, 16.8), 3.59 (1H, dd, 8.2, 5.8)	45.2
4	2.01 (2H, m)	23.3
5	2.38 (1H, m), 2.24 (1H, m)	28.1
6	4.25 (1H, t, 7.8)	60.5
7		169.7*
8		
9	5.00 (2H, d, 16.5)	47.4
Ac		27.2
Ac		171.2*

Measured in CDCl_3 at 300 and 75 MHz, respectively. Assignments were aided by ^1H COSY, TOCSY, gHMBC, and gHMBC experiments. *Exchangeable

3.3.3 항산화 활성 실험

3.3.3.1 ESR을 이용한 DPPH radical 소거 활성 실험

Radical을 가진 DPPH를 이용하여 compound의 radical 소거 능력을 측정하였으며 시료를 첨가하지 않은 control과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다. 분리한 5개의 compound를 각각 2, 1, 0.5 mM 농도로 실험을 하였다.

Compounds **6**, **8** 의 DPPH 라디칼 소거율이 높게 나타났다. Compound **6** 의 경우 각 농도에서 75%, 41%, 30%의 소거율을 보였으며 compound **8** 의 경우 84%, 83%, 80%의 소거율을 보였다.

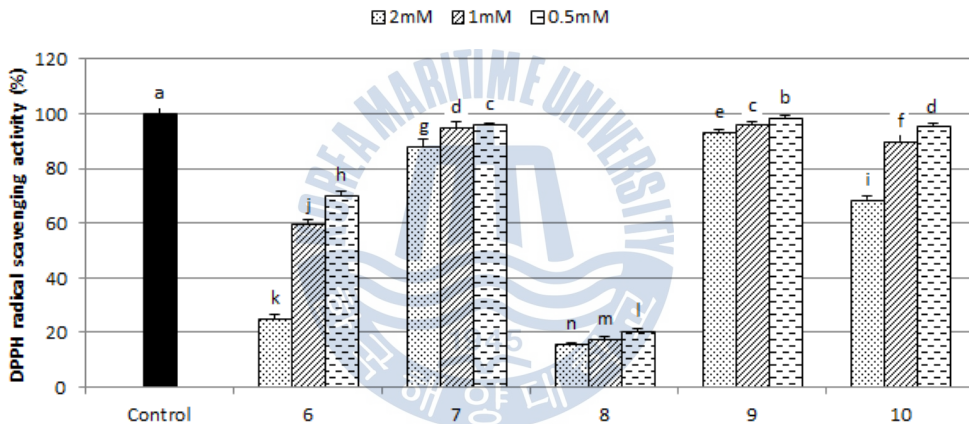


Fig. 59. DPPH radical scavenging effect of compounds **6-10** (% of control). ^{a-n} Means with the different letters are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.3.3.2 ESR을 이용한 hydroxyl radical 소거 활성 실험

Fenton reaction으로 발생한 hydroxyl radical과 DMPO를 이용하여 radical 소거율을 측정하였다.

2 mM 농도에서 모든 compound들이 각 각 92%, 91%, 90%, 65%, 63%의 소거율을 보였으며 compounds 6, 7, 8 의 경우에는 0.5 mM 농도에서도 80%이상의 hydroxyl radical 소거율을 보였다.

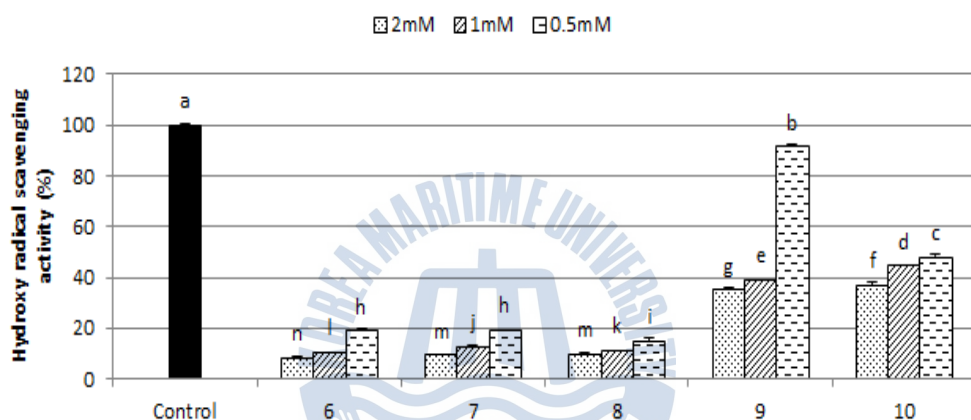


Fig. 60. Hydroxyl radical scavenging effect of compounds 6-10 (% of control). ^{a-n} Means with the different letters are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.3.3.3 ESR을 이용한 superoxide radical 소거 활성 실험

Superoxide radical 소거활성 실험은 riboflavin에 365 nm의 파장을 비춰주어 서 발생하는 superoxide radical과 DMPO를 이용하여 측정하였다.

2mM 농도에서 각각 46%, 36%, 46%, 38%, 72%의 소거율을 보였으며 compound 10의 경우에는 1 mM 과 0.5 mM 농도에서도 42%, 38%의 소거율을 보였다.

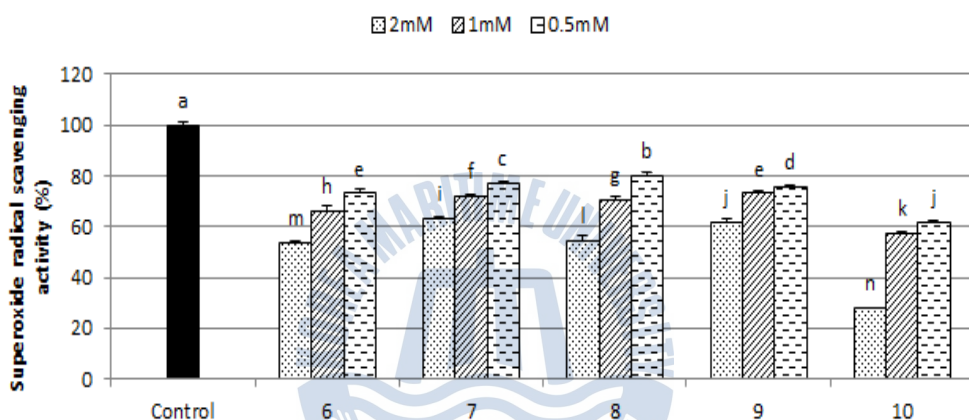


Fig. 61. Superoxide radical scavenging effect of compounds 6-10 (% of control). ^{a-n} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3.3.3.4 peroxynitrite 소거 활성 실험

형광물질인 DHR 123을 이용하여 ONOO^- 소거 활성을 검색하였으며, 시료를 첨가하지 않은 control과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다. 분리한 5개의 compound를 각각 500, 250, 100, 50 μM 의 농도에서 SIN-1과 authentic peroxynitrite의 소거율을 탐색하였으며, 대조군으로는 500, 250, 100, 50 μM L-ascorbic acid 와 penicillamine을 사용하였다.

먼저 authentic peroxynitrite에 대한 소거 활성을 측정한 결과 authentic peroxynitrite를 처리하지 않은 control과 비교하여 모든 시료에서 peroxynitrite 소거효과를 나타냈으며, 그 중에서도 특히 compound **8** 이 가장 큰 소거효과를 가졌으며 500, 250, 100, 50 μM 의 농도에서 각각 92%, 81%, 76%, 77%의 소거율을 보였다. 다음으로는 compound **6** 이 효과가 좋았으며 각 농도에서 69%, 53%, 44%, 43%의 소거율을 보였다. 모든 시료가 vitamin C와 penicillamine의 소거능력에는 미치지 못하였다.



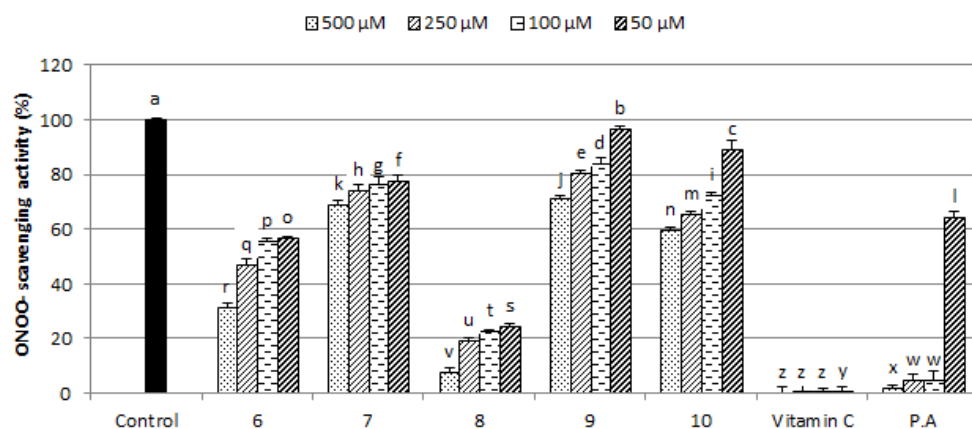


Fig. 62. Scavenging activity of compounds **6-10** on authentic ONOO^- (% of control). ^{a-z} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



3.3.3.5 SIN-1 으로부터 유도된 peroxynitrite 소거 활성

SIN-1으로부터 유도된 ONOO^- 소거결과에도 각각의 농도 500, 250, 100, 50 μM 에서 모든 시료가 SIN-1을 처리하지 않은 control보다 높은 소거 활성이 나타났다. 가장 큰 소거 효과를 보인 시료는 compound **8** 이며 각 농도에서 88%, 79%, 56%, 25%의 소거율을 보였다. 다음으로 compound **10** 이 효과가 좋았으며 각 농도에서 63%, 52%, 43%, 38%의 소거율을 보였다. 모든 시료들은 대조군인 Vitamin C와 비교하여 ONOO^- 소거활성이 미치지 못하였다.



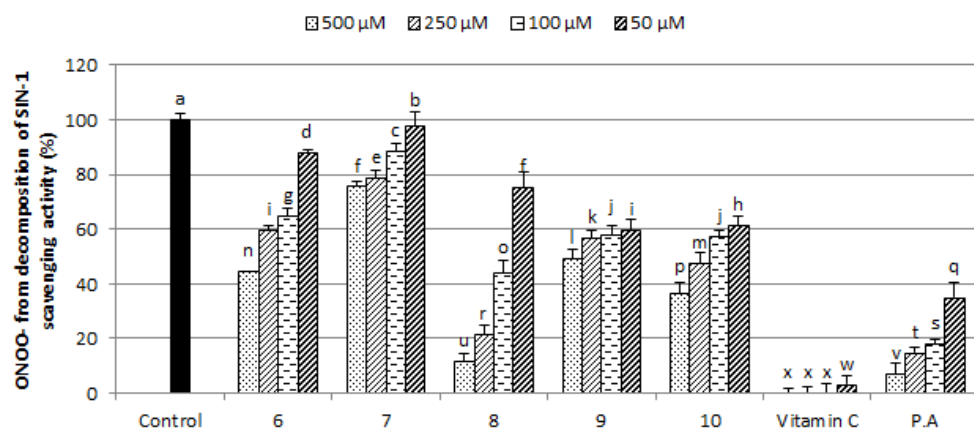


Fig. 63. Scavenging activity of compounds **6-10** on ONOO^- from SIN-1 (% of control). ^{a-x} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

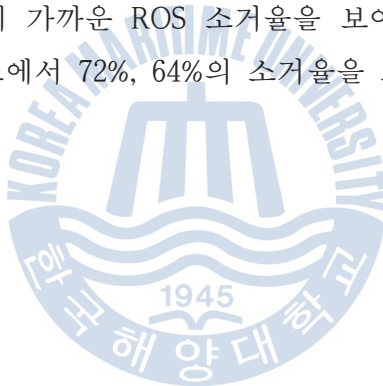


3.3.4 세포 수준에서의 활성 실험

3.3.4.1 ROS 측정

세포내 활성 산소와 반응하여 형광물질을 만들어 내는 DCFH-DA를 사용해 세포내 존재하는 활성 산소종을 DCF fluorescence로 측정하였다. 500 μ M의 H_2O_2 로 처리한 후 0, 30, 60, 90, 120분마다 활성을 측정하였다. 모든 compound 들은 각각 500, 250, 100, 50 μ M의 농도로 측정하였으며, 대조군으로는 시료를 넣지 않고 H_2O_2 를 처리한 control과 시료와 H_2O_2 를 모두 처리하지 않은 blank를 사용하여 비교하였다. H_2O_2 를 처리한 well에서는 시간에 따라 DCF fluorescence 값이 급격히 증가하였으며, H_2O_2 를 처리하지 않은 blank는 시간에 따른 DCF fluorescence 값의 변화가 거의 없었다.

Compounds **6**, **8**, **10** 의 경우 ROS 소거활성이 아주 좋게 나타났으며 120분 500 μ M 농도에서 80%에 가까운 ROS 소거율을 보여주었다. Compounds **7**, **9** 또한 120분 500 μ M 농도에서 72%, 64%의 소거율을 보였다.



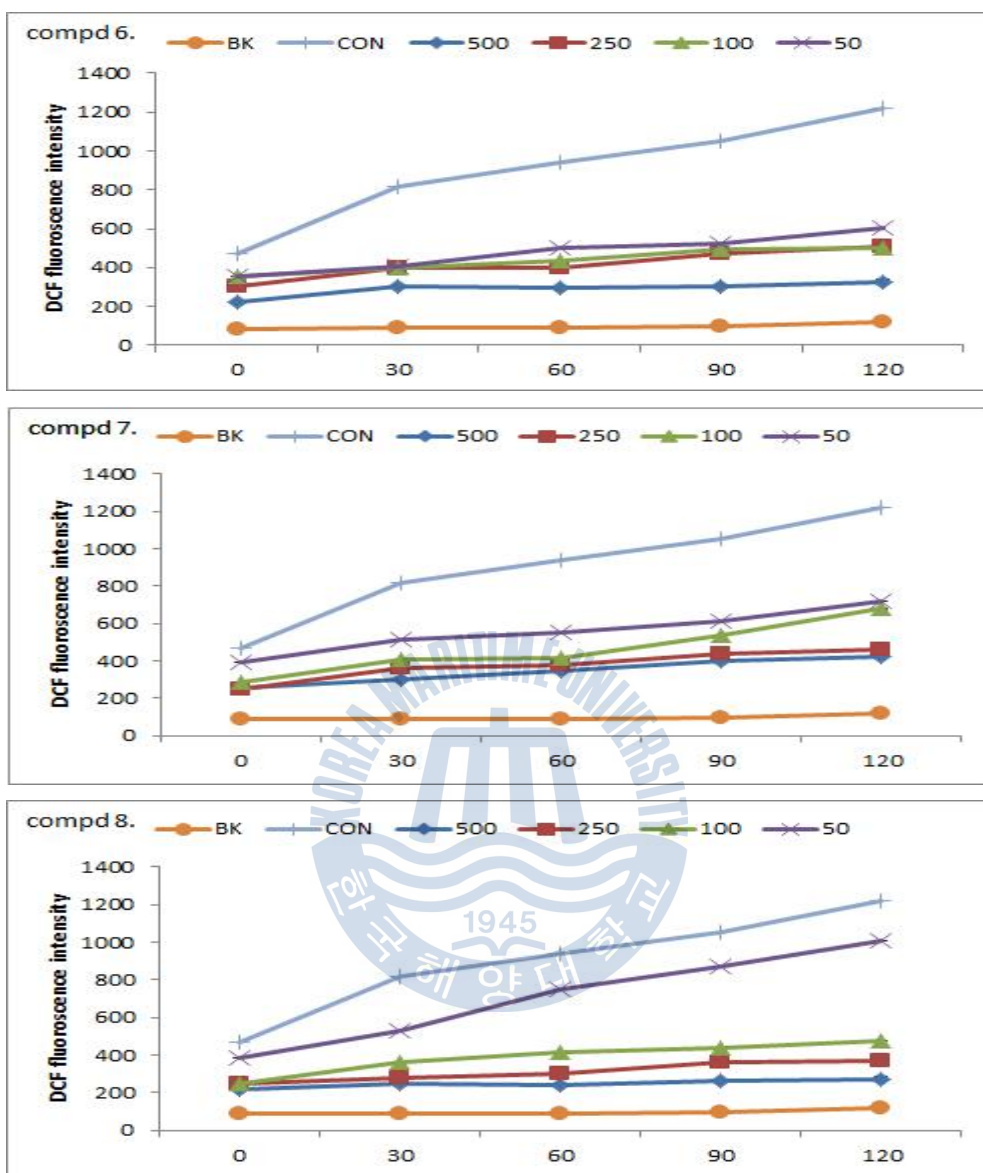


Fig. 64. Inhibition effect of compounds 6-8 on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.

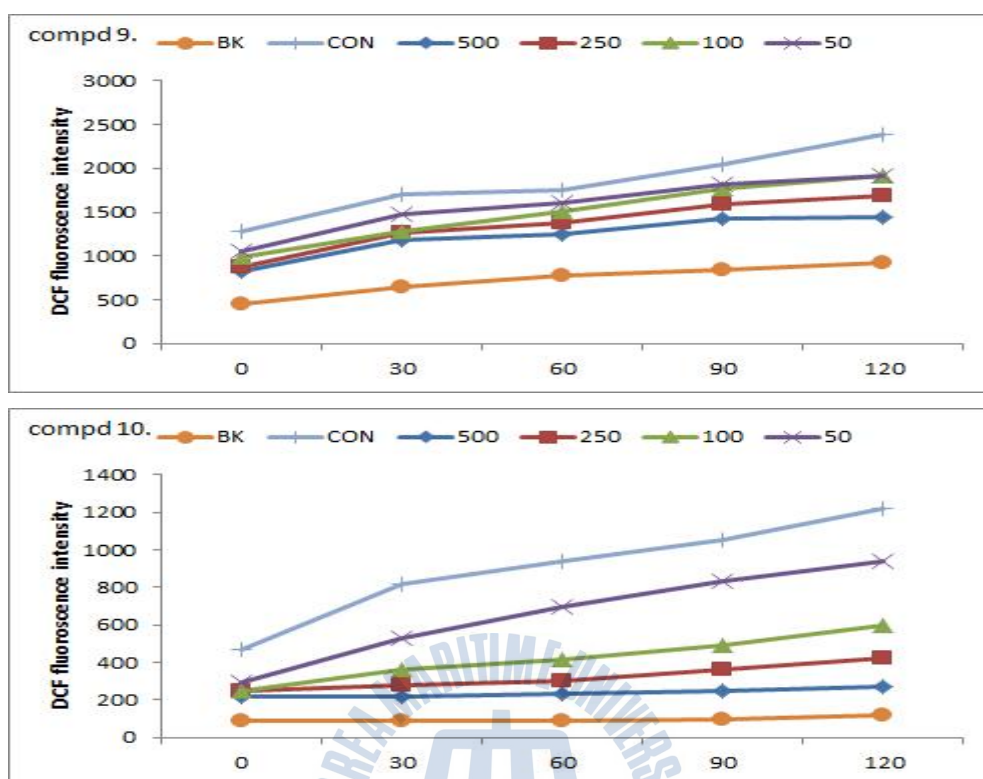


Fig. 65. Inhibition effect of compounds **9** and **10** on intracellular ROS level induced by hydrogen peroxide in HT-1080 cells.

3.3.4.2 MTT assay

3.3.4.2.1 HT-29 세포에서의 MTT 실험

대장암 세포 HT-29를 이용하여 각 시료의 500, 250, 100, 50 μ M의 농도에서 24시간 처리 후 암세포에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. Compounds 6-10 의 500 μ M에서 각각 39%, 22%, 1%, 8%, 22%의 증식 억제율을 보였다.

3.3.4.2.2 AGS 세포에서의 MTT 실험

위암 세포인 AGS를 이용하여 각 시료의 500, 250, 100, 50 μ M의 농도에서 24시간 후 암세포에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. Compounds 6-10 의 500 μ M 농도에서 각각 23%, 19%, 6%, 30%, 11%의 증식 억제율을 보였다.

3.3.4.2.3 MCF-7 세포에서의 MTT 실험

유방암 세포인 MCF-7을 이용하여 각 시료의 500, 250, 100, 50 μ M의 농도에서 24시간 후 암세포에 미치는 영향을 조사하였다. Compound 9 가 가장 좋은 활성을 보였으며 각 농도에서 47%, 24%, 10%, 4%의 증식 억제율을 보였으며 compounds 6, 7, 8 의 경우에는 500 μ M 에서 5% 정도의 증식 억제율을 보였다.

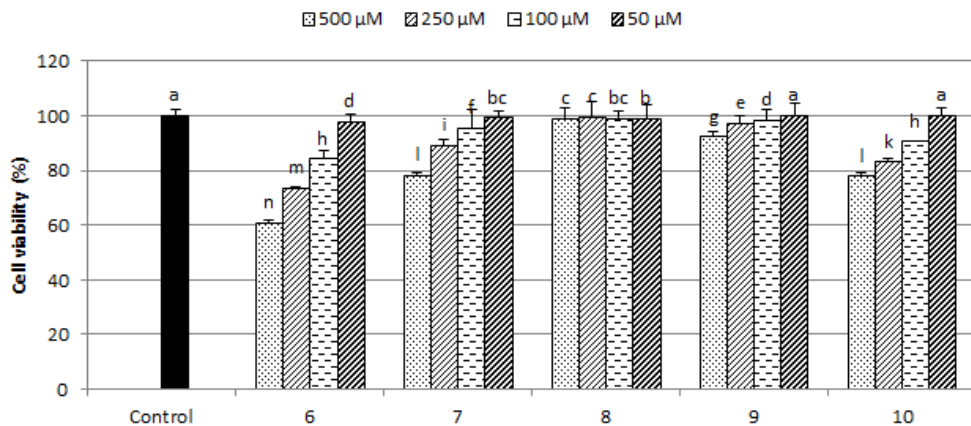


Fig. 66. Effects of crude extract and compounds **6-10** on HT-29 cell viability by MTT assay after 24 hrs. ^{a-n} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

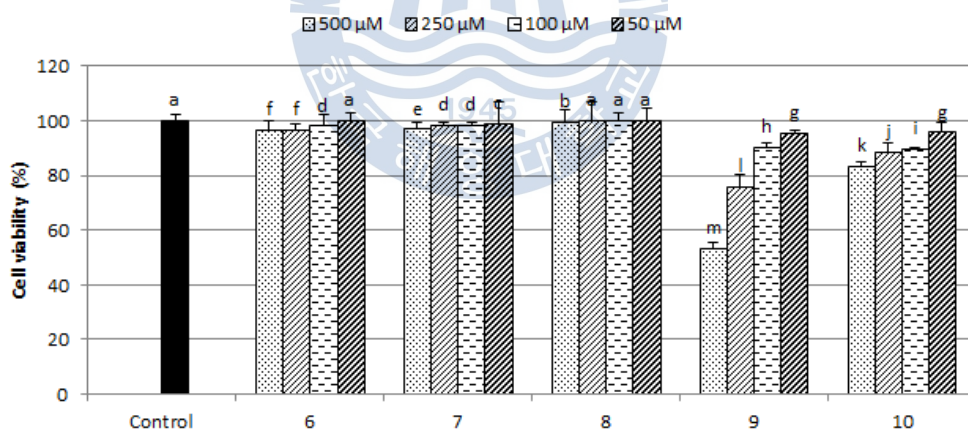


Fig. 68. Effects of crude extract and compounds **6-10** on MCF-7 cell viability by MTT assay after 24 hrs. ^{a-m} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

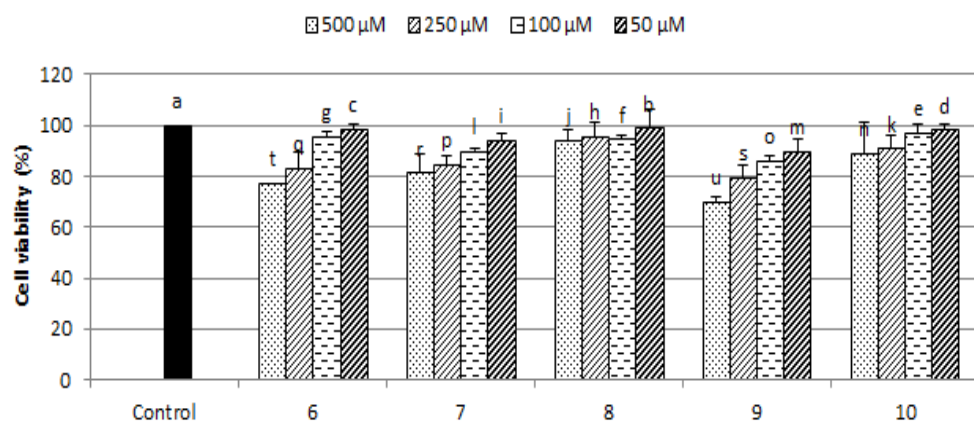


Fig. 67. Effects of crude extract and compounds **6–10** on AGS cell viability by MTT assay after 24 hrs. ^{a–u} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



3.3.4.3 NO 생성 억제 효과

NO의 기질인 L-arginine은 L-citrulline과 NO로 변하는데, 이는 빠른 속도로 안정화된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변한다. Griess 시약은 아질산염과 화학 반응하여 분홍색의 아조염을 형성하고 이것은 NO의 농도와 일치하기 때문에 이를 흡광도 540 nm에서 측정하였다. 모든 compounds를 각각 500, 250, 100, 50 μ M의 농도로 처리하여 측정하였으며, 대조군으로는 compound를 넣지 않고 1 μ g/mL LPS로 처리한 control과 compound와 LPS 모두 다 처리하지 않은 blank를 이용하여 값을 비교하였다.

NO의 생성을 측정한 결과 LPS로 자극한 control과 비교하였을 때, compound **10** 이 NO 생성 억제 효과가 좋았다. Compound **10** 의 경우 500 μ M의 농도에서 52%의 억제 효과를 보였으며 다른 농도에서도 NO를 억제효과가 나타났다. Compound **10** 를 제외한 나머지 compound에서는 NO를 억제하는 능력이 다소 떨어졌다.



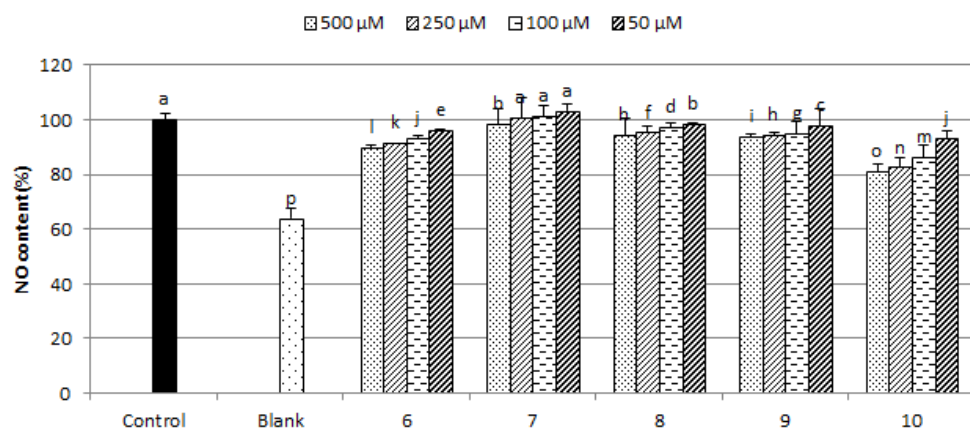


Fig. 69. Effects of crude extract and compounds **6-10** on nitrite production in Raw 264.7 cells. ^{a-p} Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.



4. 요약 및 결론

전 세계 인구의 삶의 질이 향상되면서 수명이 연장되고 있다. 수명이 증가했지만 증가한 수명만큼이나 많은 질병이 생겨났다. 그 중에서도 산화 스트레스를 발생시키는 활성 산소의 체내 농도가 높아지면 세포막이나 DNA, 단백질 등을 공격하게 되어 암이나 노화가 발생하게 된다. 이러한 활성 산소를 제거하기 위해서 항산화제의 개발이 지속적으로 이루어지고 있다. 그 중에서 물질 분리가 많이 시도되지 않은 해양 미생물로부터 항산화제를 분리하고자 하였다. 그 중에서도 젓갈의 발효에 영향을 주는 미생물을 분리하였다.

젓갈로부터 분리한 *Bacillus idriensis*를 대량 배양하여 EtOAc와 분획을 통해 배지의 유기물을 추출하였다. 이 추출물을 이용하여 silica prep TLC와 HPLC를 이용하여 5개의 2,5-diketopiperazine를 분리 하였다. 5가지 compound들에 대해 여러 가지 활성 실험을 하였다. 먼저 ESR을 이용한 DPPH radical 소거 활성 실험에서는 compound 2가 2 mM 농도에서 53%의 소거율로 가장 효과가 좋았으며 hydroxyl radical 소거 활성 실험에서는 모든 compound가 2 mM 농도에서 60%이상의 소거율을 보였으며 특히 compounds 1, 2가 2 mM, 1 mM 농도에서 90%이상의 소거율을 보였다. Superoxide radical 소거 활성 실험에서는 compound 1이 모든 농도에서 80%에 가까운 소거율을 보였다. Authentic peroxyntirite 실험의 경우에는 compounds 1, 2가 500 μ M 농도에서 각각 62%, 72%의 소거율을 보였으며 SIN-1을 이용한 peroxyntirite 실험의 경우에는 compound 2가 91%의 소거율을 보였다. ROS 실험에서는 compound 5가 가장 효과가 좋았으며 암세포에 대한 MTT 실험에서는 좋은 활성을 보이지 않았다. NO 함량 측정 실험에서는 compound 2가 500 μ M 농도에서 blank에 가까운 96%의 소거율을 보였다.

분리한 물질들에 대한 항산화 실험에서 compounds 1, 2의 결과가 좋았기 때문에 compounds 1, 2의 작용기를 이용하여 2,5-diketopiperazine과 합성하여 compounds 6, 7, 8을 합성하였고 분리한 물질들의 기본 뼈대인 compound 9와 acetylation 시킨 compound 10을 합성하였다. 합성한 compound들에 대해서도 항산화 활성 실험을 하였다. ESR을 이용한 DPPH radical 소거 활성 실험에서는

compounds **6**, **8** 이 각각 2 mM 농도에서 75%, 84%의 소거율을 보였으며 hydroxyl radical 소거 활성 실험에서는 compounds **6**, **7**, **8** 이 2 mM 농도에서 92%, 91%, 90%의 소거율을 보였다. Superoxide radical 실험에서는 compound **10** 이 2 mM 농도에서 72%의 소거율을 보였다. Authentic peroxyxynitrite 실험의 경우 compound **8** 이 500 μ M에서 92%의 소거율을 보였으며 SIN-1을 이용한 peroxyxynitrite 실험에서도 compound **8** 이 88%의 소거율을 보였다. ROS 실험의 경우 compounds **6**, **8**, **10** 이 500 μ M에서 80%에 가까운 소거율을 보였다. 암 세포에 대한 MTT 실험에서는 compound **9** 가 AGS와 MCF-7 세포에서 각각 30%, 47%의 증식 억제율을 보여 가장 활성이 좋았다. NO 함량 측정 실험에서는 compound **10** 이 52%의 소거율을 보였다.

분리한 물질과 합성한 물질의 항산화 실험 결과 compounds **1**, **2**, **8** 이 효과가 가장 좋았으며 compound **1** 의 작용기를 이용하여 합성한 compound **8** 이 효과가 좋았기 때문에 합성은 성공적이었으며 이 외에도 여러 가지 작용기가 붙은 2,5-diketopiperazine을 합성한다면 기존의 항산화제보다 좋은 항산화제를 찾을 수 있을 것이라고 예상된다.



4. 감사의 글

실험실에 들어 온지 4년이라는 시간이 지났습니다. 4년 동안 참 많은 일들이 있었습니다. 처음 실험실에 들어와서 잘 모르는 저를 많이 가르쳐 주고 졸업을 하고나서도 실험에 관한 많은 조언을 해 준 정임이 누나와 실험을 가르쳐 준 명은이 누나 그리고 정임이 누나 졸업 후에 실험실 장을 맡아서 실험실을 이끌고 많이 고생한 주완이 형에게 감사를 드립니다.

실험실 선배들의 많은 가르침도 도움이 되었지만 제가 졸업 할 수 있었던 것은 교수님께 받은 많은 가르침 덕인 것 같습니다. 선배들에게 배웠던 실험의 부족한 부분을 채워 주시고 많은 조언을 통해 실험을 완성할 수 있게 해주신 서영완 교수님께 정말 감사를 드립니다. 그리고 대학과 대학원에서 저에게 많은 가르침을 주신 안종웅 교수님, 임선영 교수님, 논문심사를 해주신 조성환 교수님께도 감사의 말씀을 드리고 싶습니다.

마지막으로 실험실에서 4년 동안 많은 것을 함께한 호준이와, 승오, 다슬이에게 고맙고, 학부생인데도 실험실에 나와 실험을 할 수 있게 많이 도와준 은신이와 희정이 그리고 새로 들어온 혜림이에게도 고맙다고 전하고 싶습니다.

이제 석사 과정을 마치고 사회로 나아가게 되었습니다. 더 심화된 것을 공부할지 취업을 할지는 아직 잘 모르겠지만 누구에게도 뒤지지 않게 열심히 살겠습니다. 그리고 실험실에서처럼 부족해도 조언해주고 도와줄 사람이 많지 않아도 지금보다 더 발전 할 수 있도록 최선을 다하겠습니다.

다시 한 번 이 논문을 완성할 수 있도록 도와주신 교수님과 실험실 부원들에게 감사의 인사를 올립니다. 감사합니다.

5. 참고문헌

통계청. 「생명표, 국가승인통계 제10135호」

강영희, 생명과학대사전, (2008).

이상현 등, (2003), 키틴 분해 미생물 첨가 키틴 퇴비 시용이 배 과원 토양의 화학성과 미생물상에 미치는 영향, *Journal of the Korean society for horticultural science*, 44(2), pp.201-206.

하우중, 김영철, 정현채, 박서기, (2014), 키틴분해세균, 키틴 및 그들의 산물이 함유된 미생물제에 의한 오이의 뿌리혹선충(*Meloidogyne* spp.) 방제. *Research in Plant Disease*, 20(20), pp.112-118.

김성겸, (2009), 갯벌로부터 키틴 분해 미생물의 분리 및 chitinase 유전자의 특성 연구, 순천대학교 도서관.

Shengrong Liaoa. et al., (2014). Design and synthesis of novel soluble 2,5-diketopiperazine derivatives as potential anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 83(18), pp.236-244.

Blois M. S., (1958), Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 25, pp.1199-1200.

Beda, N., and A. Nedospasov, (2005), A spectrophotometric assay for nitrate in an excess of nitrite. *Nitric Oxide*, 13, pp.93-97.

Folin, O., and W. Denis, (1912), On phosphotungstic phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.*, 12, pp.239-249.

Green L. C., et al., (1982), Analysis of Nitrate, Nitrite, and [15N] Nitrate in Biological Fluids. *Anal. Biochem.*, 126, pp.131-138.

Kim M. C., et al., (2010), Identification and Antioxidant Activity using Electron Spin Resonance Spectrometry of Antioxidant Producing Marine Actinomycetes *Streptomyces* sp. ACT-18., *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, 38(1), pp.24-31.

Rosen G. M., Rauckman E. J., (1984), Spin trapping of superoxide and hydroxyl

- radicals., *Methods Enzymol.*, 105, pp.198-209.
- Gamini S. Jayatilake, et al., (1996), Metabolites form and Actarctic Sponge-Associated Bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Natural Products*, 59, pp.293-296.
- Martin Sjogren, et al., (2006), Antifouling activity of synthesized peptide analogs of the sponge metabolite barettin, *PEPTIDES*, 27, pp.2058-2064.
- Faouzi Fdhila, Vitoriano Vazquez, Jose Luis Sanchez & Ricardo Riguera, (2003), DD-Diketopiperazines : Antibiotics Active against *Vibrio anguillarum* Isolated from Marine Bacteria Associated with Cultures of *Pecten Maximus*. *NATURAL PRODUCTS*, 66(10).
- M. Graz, et al. (1999), Antimicrobial activity of selected cyclic dipeptides, *Pharmazie*, 54, pp.772-775.
- Dae-Kyun Park, et al. (2006), Cyclo(Phe-Pro) Modulates the Expression of ompU in *Vibrio* spp, *Journal of Bacteriology*, 188(6), pp.2214-2221.
- Maristela B. Martins and Ivone Carvalho, (2007), Diketopiperazines: biological activity and synthesis, *Tetrahedron*, 63, pp9923-9932.
- Tadashi Furukawa, et al. (2012), Cyclic dipeptides exhibit potency for scavenging radicals, *Bioorganic & Medicinal chemistry*, 20, pp.2002-2009.
- Jia-Chen Zi, et al. (2010), Minor constituents from the tuvers of *Gymnadenia conopsea*, *Jouranl of Asian Natural Products Research*, 12(6), pp.447-484.
- Sebastian M. Marcuccio and John A. Elx, (1984), Pyrazine Chemistry. II reduction of 3,6-Dibenzylidenepiperazine-2,5-diones, *Aust. J. Chem.*, 37, pp.1791-1794.
- Kenneth D. Kopple and Hagop G. Ghazarlan, (1967), Aconvenient Synthesis of 2,5-PiPerazinediones, *The Jouranl of Organic Chemistry*, pp.862-864.
- Giancarlo zanotti, et al. (1983), Cyclols, cyclodepsipeptides, and

- N-acyl-diketopiperazines form linear precursors, *Int. J. Peptide Protein Res*, 22 pp.410-421.
- Silvio Cerrini, et al. (1984), *N*-acyl-diketopiperazines Crystal structure and conformation of *N*-(*N*-phenylacetyl-L-alanyl)-cyclo-(L-phenylalanyl-D-prolyl), *Int. J. Peptide Protein Res*, 23, pp.223-229.
- Anna Calcagni, et al. (1985), *N*-acyl-diketopiperazines II. Crystal structure and conformation of *N*-(pyruvoyl)-cyclo-(L-phenylalanyl-D-prolyl), *Int. J. Peptide Protein Res*, 26 pp.166-173.
- Alan D. Borthewick, (2012), 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, Reactions, Medicinal Chemistry, and Bioactive Natural Products, *CHEMICAL REVIEWS*, 112, pp.3641-3716.
- Albrecht Lieberknecht and Helmut Griesser, (1987), What is the structure of baretin ? novel synthesis of unsaturated diketopiperazines, *Tetrahedron letters*, 28(37), pp.4275-4278.
- Erik A. Hagen, Thrina Loennechen, Leiv K. Sydnes, and Arne J. Aasen, (1983), Synthesis of Ac-Asp-Gly-Ser and Ac-Asp-Pro-Leu-Gly-NH₂. *Int. J. Peptide Protein Res*, 23. pp.642-649.
- Bruno M. Schiavi, David J. Richard, and Madeleine M. Joullie, (2002), Total Synthesis of Isoroquefortine C, *J. Org. Chem.* 67, pp.620-624.
- Yoshio Hayashi, et al., (2000), Total synthesis of anti-microtubule diketopiperazine derivatives: Phenylhistin and aurantiamine, *J. Org. Chem.*, 65, pp.8402-8405.
- Toshiaki Aoki, et al., (2006), Total Synthesis of (-)-Neoechinulin A, *SYNLETT*, 5, pp.0677-0680.
- Ning Shangguan and Madeleine M. Joullie, (2009), Total synthesis of isoroquefortine E and phenylhistin, *Tetrahedron Letters*, 50, pp.6755-6757.

- Yuri Yamazaki, et al., (2009), Acid catalyzed monodehydro-2,5-diketopiperazine formation from *N*- α -ketoacyl amino acid amides, *Tetrahedron*, 65, pp.3688-3694.
- Jurgen Liebscher and Shangde Jin, (1999), 3-Ylidenepiperazine-2,5-diones as versatile organic substrates, *Chem. Soc. Rev.*, 28, pp.251-259.
- Elena Bunuel, et al., (2003), Asymmetric syntheiss of substituted 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acids *via* diketopiperazine methodology, *Org. Biomol. Chem.*, 1, pp.2531-2542.
- Jernej Waggar, Uros Groselj, Jurij Svete, and Branko Stanovnik, (2010), Synthesis of Racemic, *n*-Benzylated neoechinulin A and isoneoechinulin A, *SYNLETT*, 8, pp.1197-1200.
- Kouji Kuramochi, et al., (2008), Syntheiss and Biological Activities of Neoechinulin A Derivateves: New Aspects of Structure-Activity Reationships for Neoechinulin A, *Chem. Pharm. Bull.*, 56(12), pp.1738-1743.
- Chung-Gi Shin, Haruo Kato, Yasuchika Yonezawa, and Masato Hayakawa, (1980), Synthesis and structural assignment of naturally occurring 3-benzyl-6-benzylidene-2,5-piperazinedione, *HETEROCYCLES*, 14(11), pp.1767-1770.
- Kaneo Kanoh, et al., (1999), Syntheiss and Biological Acivities of Phenylahistin Derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 7, pp.1451-1457.
- Shinji Yamada, Setsuko Yaguchi, and Kaori Matsuda, (2002), *N*-Acylation of amides with acid anhydrides by way of dual activation using $\text{MgBr} \cdot \text{OEt}_2$, *Tetrahedron Letters*, 43, 647-651.
- Justin Bryans, et al., (1996), Inhibition of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Activity by Two Diketopiperazines, XR330 and XR340 Produced by *Streptomyces* sp., *The Journal of Actibiotics*, 49(10), pp.1014-1021.
- Barry Halliwell, John M. C. Gutteridge, and Okezie I. Aruoma, (1987), The

Deoxyribose method: A simple “Test-Tube” Assay for Determination of Rate Constants for Reactions of Hydroxyl Radicals, *Analytical Biochemistry*, 165, pp.215-219.

